

Université de Montréal

**Déterminants biochimiques, génétiques et épigénétiques de
l'encéphalomyélite myalgique**

Par

LYNDA CHALDER

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc)

en Biochimie

option Génétique Moléculaire

Novembre, 2017

© Lynda CHALDER, 2017

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Déterminants biochimiques, génétiques et épigénétiques de
l'encéphalomyélite myalgique**

présenté par :

Lynda CHALDER

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luis Rokeach, président-rapporteur

Yves Durocher, membre du jury

Alain Moreau, directeur de recherche

RÉSUMÉ

L'encéphalomyélite myalgique (EM) est une maladie chronique et complexe caractérisée par une fatigue récurrente et persistante qui dure plus de 6 mois, des douleurs et une panoplie d'autres symptômes (1, 2). Parmi les biomarqueurs testés, nous avons mesuré l'homocystéine plasmatique dans notre cohorte de patients EM (n=112) et chez le groupe témoin (n=58). Nous avons stratifié les patients et les sujets témoins en fonction de leurs niveaux plasmatiques en Hcy. L'hyperhomocystéinémie (>15 µmol/L) a été observée avec une fréquence plus élevée chez un sous-groupe de patients EM (22.3%) que chez un groupe témoin (15.5%), tandis que la fréquence de l'hypohomocystéinémie (<5 µmol/L) était de 32.1% chez des patients EM et de 50% chez des individus témoins.

Cette étude visait à mieux comprendre la contribution de l'Hcy au niveau de l'exacerbation de certains symptômes de l'EM et d'élucider les mécanismes moléculaires et génétiques associés à une hyperhomocystéinémie modérée et aussi à une hypohomocystéinémie chez les patients atteints d'EM. À l'aide de questionnaires standardisés (DSQ, MFI-20 et SF-36) des différences cliniques ont été observées entre les sous-groupes. En particulier, l'hypohomocystéinémie chez certains patients EM semblait être associée à l'exacerbation des symptômes neurologiques tandis que les patients EM hyperhomocystéinémiques présentaient des scores plus sévères pour le malaise après-effort ($P < 0,05$). Dans ce contexte, la contribution de cofacteurs nutritionnels (vitamines B6, B12, C et folate), et de facteurs génétiques au niveau de certains variants dans les gènes de la voie métabolique de l'Hcy, des récepteurs et transporteurs vitaminiques ont été investigués. Les niveaux urinaires et plasmatiques en vitamines B6, B12, C et folate ont été dosés par méthode ELISA. Les patients EM ayant une hyperhomocystéinémie ne présentaient pas de carence nutritionnelle contrairement à la sous-population du groupe témoin qui avait également une hyperhomocystéinémie. Au niveau génétique, le génotypage de 110 polymorphismes (SNPs) connus pour réguler les niveaux plasmatiques en Hcy a été réalisé. Lors d'une première analyse génotypique entre les patients EM et les contrôle, le SNP rs7703033 (MTRR) présentait une forte association avec la maladie EM. De plus, ces travaux ont mis en évidence une association entre le SNP rs1801198 (TCN2) et l'hypohomocystéinémie chez les patients EM. Ces patients EM présentaient aussi des niveaux moyens en vitamine B12 plasmatique plus élevés. Certains SNPs présentaient une forte association avec l'hyperhomocystéinémie chez une sous-groupe de patients EM, notamment rs2124459 (CBS), rs17367504 (MTHFR), rs4257763 (SLC23A1) et rs1195646 (SLC23A2).

Ces résultats démontrent que les niveaux circulants en Hcy exacerbent les symptômes de la maladie chez les personnes atteintes d'EM dans la population québécoise en Hcy en raison de prédispositions génétiques permettant de différencier les sujets atteints en sous-groupe spécifiques.

Mots-Clés :

Encéphalomyélite myalgique (EM), hyperhomocystéinémie, hypohomocystéinémie, vitamines B6 - B12 - C – folate, polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP), génotypage, microARN

ABSTRACT

Myalgic encephalomyelitis (ME) is a chronic and complex disease characterized by recurrent and persistent fatigue that lasts for 6 months or more and is associated with pain and an abundance of other symptoms (1,2). Among the biomarkers tested, we measured plasma homocysteine (Hcy) in our ME cohort (N = 112) as well as in an age- and sex-matched group of healthy controls (N = 58). Patients and control subjects were stratified according to their Hcy plasma levels. Hyperhomocysteinemia ($>15 \mu\text{mol/L}$) was observed at a higher frequency in the EM patients (22.3%) than in the control group (15.5%), while the frequency of hypohomocysteinemia ($<5 \mu\text{mol/L}$) was 32.1% in EM patients and 50% in controls.

The aim of this study was to better understand the contribution of Hcy in the exacerbation of ME symptoms, as well as to elucidate the molecular and genetic mechanisms associated with moderate hyperhomocysteinemia and hypohomocysteinemia in patients with myalgic encephalomyelitis. Standardized questionnaires (DSQ, MFI-20 and SF-36) revealed clinical differences between the subgroups. In particular, hypohomocysteinemia was associated with an exacerbation of neurological symptoms in some ME patients, while hyperhomocysteinemic ME patients had higher scores for post-exertional malaise ($P < 0.05$). In this context, we investigated the contribution of nutritional cofactors (vitamins B6, B12, C and folate) and genetic factors in gene variants associated with the Hcy metabolic pathway or with vitamin receptors and transporters. The urinary and plasmatic levels of vitamins B6, B12, C and folate were measured by ELISA. Hyperhomocysteinemic ME patients did not show any nutritional deficiencies, unlike the subpopulation of hyperhomocysteinemic control subjects. At the genomic level, we also genotyped 110 SNPs known to regulate plasmatic levels of Hcy. In a first genotypic analysis between ME patients and controls, the SNP rs7703033 (MTRR) had a strong association with the disease. In addition, this work demonstrated an association between SNP rs1801198 (TCN2) and hypohomocysteinemia in ME patients. Moreover, mean plasmatic levels of vitamin B12 were higher in these ME patients. A strong association was found between certain SNPs such as rs2124459 (CBS), rs17367504 (MTHFR), rs4257763 (SLC23A1) and rs1195646 (SLC23A2) and hyperhomocysteinemia in ME patients.

These results demonstrate that circulating levels of Hcy exacerbate the symptoms of the disease in people with ME in the Quebec population in Hcy because of genetic predispositions that differentiate subjects with specific subgroups.

Keywords:

Myalgic encephalomyelitis (ME), hyperhomocysteinemia, hypohomocysteinemia, vitamins B6 - B12 - C – folate, single nucleotide polymorphism (SNP), genotyping, microRNA

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vi
Liste des abréviations.....	vii
Dédicace.....	ix
Remerciements	x
Chapitre 1. Revue de la littérature	
A. Encéphalomyélite myalgique.....	1
1. Présentation de l'encéphalomyélite myalgique et mise en contexte.....	1
2. Prévalence et incidence.....	2
3. Critères de diagnostic, classification internationale et définition.....	4
4. Symptômes cliniques et diagnostic différentiel	6
5. Étiologie et pathogenèse.....	12
B. L'homocystéine : un facteur de risque indépendant.....	18
1. Métabolisme de l'homocystéine et les formes circulantes.....	18
2. Caractéristiques d'une hyperhomocystéinémie.....	24
2.1 Facteurs favorisant une élévation de l'homocystéine circulante.....	25
2.2 Conséquences de l'hyperhomocystéinémie.....	31
3. Hypohomocystéinémie: facteur de risque indépendant associé à la sévérité de l'EM?31	
3.1 Contexte d'exploration d'une hypohomocystéinémie.....	32
3.2 Facteurs déterminants d'une baisse de l'homocystéine circulante.....	32
C. Considération du rôle épigénétique des microARNs dans la régulation du métabolisme de la méthionine – homocystéine.....	33
1. Généralité sur les microARNs.....	33
1.1 Mécanisme de biogenèse de cette classe d'ARN non-codant	34
1.2 Mode d'action des microARNs.....	37
1.3 Accumulation des microARNs dans les fluides biologiques.....	38
1.4 microARNs circulants : Fonction et potentielle application en clinique.....	40
2. microARNs impliqués dans la régulation des niveaux d'homocystéine.....	42
2.1 Implication des microARNs dans la régulation de l'homocystéine.....	42
2.2 microARNs : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques de l'homocystéine ?.....	44
3. microARNs potentiellement impliqués dans la pathogenèse de l'EM.....	45
3.1 miARNs impliqués dans la manifestation des symptômes de l'encéphalomyélite myalgique.....	45
3.2 miARNs : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques dans l'EM.....	46
D. Hypothèse et Objectifs.....	49
Chapitre 2. Article.....	50
Genetic and nutri-epigenetic regulation of plasma homocysteine levels in myalgic encephalomyelitis	

Authors' contribution.....	50
Abstract.....	52
Introduction.....	54
Results	55
Discussion.....	59
Tables.....	63
Materials and methods.....	66
Acknowledgements	69
References	70
Chapitre 3. Discussion	
1. Relation des niveaux plasmatiques en homocystéine sur les symptômes des patients EM.....	85
2. Recherche des causes pouvant expliquer les changements anormaux des niveaux circulants l'homocystéine.....	87
3. Investigation au niveau génétique.....	89
Chapitre 4. Perspective	94
Chapitre 5. Conclusion	96
Chapitre 6. Références	97
Annexes	
Annexe 1 : Questionnaire DSQ.....	111
Annexe 2 : Questionnaire MFI-20.....	125
Annexe 3 : Questionnaire SF-36.....	127

Liste des figures

Figure 1. Estimation de la prévalence de l'encéphalomyélite myalgique, mais aussi la fibromyalgie chez la population canadienne, basée sur les données de l'organisme Statistique Canada de 2010.....	3
Figure 2. Représentation schématique du corps humain et des principaux systèmes perturbés chez les personnes atteints d'encéphalomyélite myalgique.....	13
Figure 3. Structure de l'homocystéine.....	19
Figure 4. Représentation schématique du métabolisme de la méthionine – homocystéine.....	20
Figure 5. Représentation schématique du métabolisme cellulaire de la vitamine B12 (cobalamine)	22
Figure 6 : Organisation génomique, Biogenèse canonique et Mode d'action principal des miARNs.....	36
Figure 7 : miARNs circulants.....	40

Liste des tableaux

Tableau 1. Combinaison des symptômes cliniques caractérisant l'encéphalomyélite myalgique selon Fukuda K.....	4
Tableau 2. Variété de symptômes mentionnée par les patients EM.....	8
Tableau 3. Diversité des agents infectieux associés à l'encéphalomyélite myalgique.....	14
Tableau 4 : les différentes formes d'homocystéine plasmatique.....	23
Tableau 5: Les valeurs normales et pathologiques de l'homocystéine plasmatique.....	25
Tableau 6. Des médicaments appartenant à la classe d'agents immunosuppresseurs pouvant affecter les niveaux d'homocystéine.....	26
Tableau 7 : Principaux polymorphismes génétiques dans des gènes pour des enzymes directement ou indirectement impliquées dans la voie métabolique de la méthionine et associées au phénotype hyperhomocystéinémie.....	30
Tableau 8. Liste des microARNs candidats identifiés dans différentes études étant associés à l'EM.....	47

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
AHCY : S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH)
ARN : acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique: ARN messenger
ATP : adénosine triphosphate
AVC : accident vasculaire cérébral
BHMT : bétaine-homocystéine méthyltransférase
B6 : vitamine B6 (pyridoxine)
B12 : vitamine B12 (cobalamine, Cbl)
B9 : folate ou vitamine B9
CUBN : cubiline
CBS : cystathionine-béta-synthétase
CDC : Center for Diseases Control
CIM : Classification Internationale des Maladies
CTH : cystathionine gamma-lyase
DHFR : dihydrofolate réductase
DNMT : méthyltransférases
DSQ : DePaul Symptom Questionnaire
EBV : virus d'Epstein-Barr
EM : encéphalomyélite myalgique
SFC : syndrome de fatigue chronique
ESCC : Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FI : facteur intrinsèque
FM: fibromyalgie
GWAS : Étude d'association pangénomique (genome-wide association study)

Hcy : homocystéine
Hhcy : hyperhomocystéinémie
LCR : liquide-céphalo-rachidien
miARN : microARN
MFI : Multidimensional Fatigue Inventory-20
MS : méthionine synthétase
MTHFR : 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR : méthionine synthase
MTRR : méthionine synthase réductase
NF- κ B: nuclear factor-kappa B
NO : oxyde nitrique
PAEM : patients atteints d'encéphalomyélite myalgique
PEM : malaise après l'effort (post-exertional malaise)
RCPG: récepteurs couplés aux protéines G
RE : réticulum endoplasmique
SAM : S-adénosylméthionine
SAH : S-adénosylhomocystéine
SF-36 : Medical Outcome Study Short Form 36 item Health Survey
SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
THF : tétrahydrofolate
UTR : Untranslated Transcribed Region

*À ma mamie Gégé,
Loin des yeux & Près du cœur*

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à mon directeur de recherche, Dr Alain Moreau, pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début de notre collaboration, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et son aide précieuse sur le plan scientifique.

Je remercie également

- Madame Anita Franco pour son soutien et son accompagnement
- Evguenia pour son écoute et son encouragement
- Ma Maman pour le soutien continu,

Les mots ne sauraient exprimés ma profonde gratitude car elle a toujours été là, le plus souvent au bout du fil pour m'encourager en me répétant « *Si ou fô ou pa fèb - bôd lanmè pa loin* » ! C'est elle qui m'a inculqué les vraies valeurs que je possède aujourd'hui.

Je tiens à conclure ses remerciements avec mon "*fan club*" pour m'avoir toujours encouragé : Angéla mamie doudou, mon Papa, tonton José, Mélissa, Yann, Doris, et Jennyfer. Peu importe l'endroit où je suis, vous êtes et serez toujours dans mon cœur.

Chapitre 1. Revue de la littérature

A. L'encéphalomyélite myalgique

1. Présentation de l'encéphalomyélite myalgique et mise en contexte

L'encéphalomyélite myalgique (EM), aussi connue sous le nom de syndrome de fatigue chronique (SFC), est une pathologie chronique, complexe et débilitante de plusieurs systèmes, dont la genèse fait intervenir des déterminants biochimiques, métaboliques, génétiques et épigénétiques. Les termes EM et SFC décrivent, de ce fait, une maladie physique complexe qui se caractérise par des groupes de symptômes qui incluent : une fatigue pathologique, un malaise amplifié après effort, un dysfonctionnement cognitif et immunitaire, un sommeil non réparateur et de la douleur (2, 3). Un des symptômes cardinaux est une profonde exacerbation post-effort des symptômes qui perdurent dans le temps (4).

L'EM est une maladie commune, souvent gravement invalidante et coûteuse. On estime qu'elle affecte plus de 600,000 Canadiens. L'un des principaux défis dans le traitement efficace de l'EM réside dans le moment du diagnostic et les différentes phases de la maladie. Par conséquent, il existe un besoin important d'identifier des biomarqueurs pour l'EM (3, 4). De plus, la grande hétérogénéité clinique de la maladie et les différences entre les sexes suggèrent fortement l'existence de plusieurs sous-types de patients ou plutôt d'un spectre de l'EM à l'instar d'autres maladies complexes comme l'autisme. Par conséquent, l'EM est difficile à diagnostiquer et à traiter parce que son étiologie et sa physiopathologie ne sont pas bien comprises (3, 4).

2. Prévalence et incidence

En se référant aux données épidémiologiques de l'ESCC (Enquête sur la santé dans les collectivités canadiennes) de 2010, la prévalence de l'EM est estimée à environ 1.4% dans la population générale au Canada (5). L'estimation de la prévalence rapportée dans différentes enquêtes populationnelles à l'échelle internationale révèlent que le nombre de cas atteints d'EM varie entre 0.007% et 2.8% dans la population générale, ce qui représente le pourcentage des patients ayant reçu un diagnostic pour ce syndrome inexpliqué (6, 7).

Toutefois, nous pouvons noter une variabilité en ce qui concerne la prévalence de l'EM au sein des différentes études populationnelles, due aux nombreuses définitions existantes, les critères de sélection des participants malades, n'étant pas les mêmes (6, 8, 9).

La prévalence de l'EM est plus élevée chez les femmes, comme nous pouvons le voir sur la figure 1 (5, 6). Au niveau de l'incidence de la maladie, la manifestation des symptômes survient plus fréquemment entre la vingtaine et la quarantaine de façon soudaine et le plus souvent, lorsque la personne est généralement active (6). Cependant, les enfants et les adolescents ne sont pas épargnés (10, 11). De plus, l'EM se manifeste chez tous les groupes ethniques (12).

L'encéphalomyélite myalgique et la fibromyalgie (FM), deux syndromes d'étiologie mal comprise, partagent des caractéristiques cliniques communes telles que la fatigue mais également les myalgies, un sommeil non réparateur et des troubles neurologiques et cognitifs (5, 13). En effet, certains symptômes, notamment la fatigue, sont communs aux deux conditions pathologiques, ce qui rend le diagnostic difficile et ainsi que leur différenciation. La fibromyalgie (FM), quant à elle, se présente comme étant le syndrome du système musculo-squelettique où la composante principale est la douleur (14-16). La prévalence de la fibromyalgie (FM), syndrome présentant des symptômes similaires et une comorbidité très fréquente dans l'EM, est approximativement de 1.5% dans la population (5, 13).

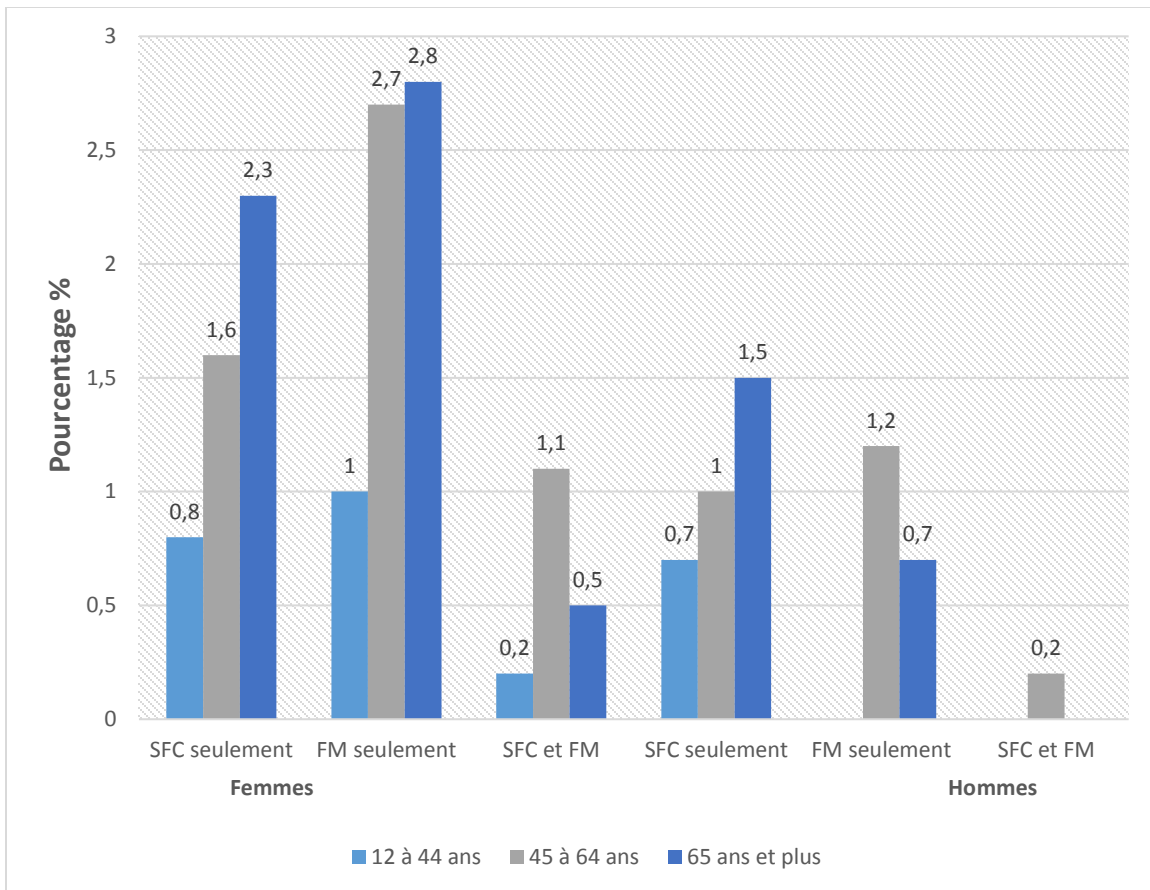


Figure 1. Estimation de la prévalence de l'encéphalomyélite myalgique, mais aussi la fibromyalgie chez la population canadienne, basée sur les données de l'organisme Statistique Canada de 2010. Figure adaptée de Rusu C, et *al.* (5).

L'analyse de ces données montre une variation quasiment semblable pour ses deux entités, EM et FM (Figure 1). Collin SM et *al.*, ont rapporté que deux pics d'incidence sont observés pour l'EM, soit dans la période de 10-19 ans et la période 30-39 ans (10).

Chez la population ciblée par l'EM, leur état de santé et leur situation socio-professionnelle sont gravement impactés, ce qui a une influence sur les ressources des services de santé (2, 17).

3. Critères de diagnostic, classification internationale et définition

En 1988, le « Center for Diseases Control » (CDC), institution américaine ayant pour but de surveiller les maladies, a publié une première définition du « Syndrome de fatigue chronique » basée sur les critères élaborés par Dr Gary P. Holmes et ses collaborateurs (18). Le syndrome de fatigue chronique a vraisemblablement existé, avant d'être reconnu comme étant une maladie dans la nosologie médicale (19, 20). Suite à cette reconnaissance officielle, les critères de diagnostic ont été modifiés plus d'une fois et ils diffèrent l'un de l'autre selon le nombre et la liste des symptômes proposés pour poser le diagnostic de cette pathologie. Dans l'ensemble, cela pouvait introduire des confusions, notamment dans la comparaison, l'interprétation et la reproductibilité des études cliniques (18, 21).

Une version révisée de ses critères, éditée par Fukuda K et ses collaborateurs, en 1994, a été adoptée par le CDC (21). À ce jour, cette dernière est considérée comme étant une norme dans de nombreux pays (20).

Tableau 1. Combinaison des symptômes cliniques caractérisant l'encéphalomyélite myalgique selon Fukuda K.

Critères de diagnostic primaires	Symptômes secondaires (au moins 4) permettant de confirmer le diagnostic	Critères d'exclusion
Fatigue persistante et récurrente qui dure depuis plus de six mois	<ul style="list-style-type: none">Maux de gorge○ Myalgie ou faiblesse musculaire○ polyarthralgies○ Maux de tête généralisés○ Malaise après l'effort et aggravation de la fatigue suite à un effort physique ou mental○ Troubles du sommeil○ Ganglions cervicaux et/ou axillaires douloureux○ Dysfonctionnements neuropsychologiques (cognitifs)	<p>Toutes autres conditions cliniques pouvant provoquer une fatigue (cancers, lupus...)</p> <p>Diagnostic actuel ou antécédent de maladies psychiatriques (épisodes dépressifs graves, schizophrénie, trouble bipolaire, démence, anorexie, boulimie...)</p> <p>Obésité sévère</p> <p>Abus de drogues ou médicaments, d'alcool</p>

En se référant aux critères classiques de Fukuda, la distinction de deux groupes de symptômes est mise en évidence, primaire et secondaire en excluant d'autres maladies.

De nombreuses définitions existent telles que celle d'Oxford (Sharpe MC et *al.*, 1991) qui souligne une fatigue mentale ou bien la définition canadienne qui exclut des patients ayant des symptômes associés à une maladie mentale mais où le malaise après-effort est pris en compte (20, 22-24).

Le Comité du Consensus International sur l'Encéphalomyélite Myalgique a publié un manuel permettant de caractériser ce syndrome classé parmi les maladies neurologiques selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), figurant dans la 10^{ème} édition de la Classification Internationale des Maladies (CIM-10) (25).

Cependant, les lignes directrices permettant l'évaluation de l'encéphalomyélite myalgique varient d'une définition à une autre, mais également ce syndrome possède plusieurs appellations sans oublier les divers symptômes ressentis par les patients (11, 19, 26, 27). Depuis une trentaine d'années, le nombre de publications a considérablement augmenté. Toutefois, les études portant sur le syndrome de fatigue chronique se sont référées à plusieurs critères diagnostiques pour recruter les sujets malades, ce qui peut s'avérer être une faiblesse lors de la comparaison de différentes études.

À ce jour, il existe des sites internet qui permettent d'informer le grand public mais aussi les professionnels de la santé et les acteurs de la recherche sur ce syndrome. Nous pouvons consulter celui de l'Association Québécoise de l'Encéphalomyélite Myalgique (www.aqem.org).

4. Symptômes cliniques et diagnostic différentiel

4.1 Symptômes cliniques

L'encéphalomyélite myalgique se caractérise par un ensemble de symptômes médicalement inexpliqués, toutefois, la fatigue est le symptôme initial et principal (28). Les critères de classification de Fukuda, mentionnés par le CDC, présentent la liste des critères secondaires et des conditions médicales qui peuvent causer une fatigue; de ce fait ces dernières sont à exclure de prime abord avant d'établir un diagnostic (21, 22). Dans cette section, nous présenterons les différents symptômes cliniques (primaires et secondaires).

Caractéristiques de la fatigue

Les patients atteints d'encéphalomyélite myalgique présentent une fatigue récurrente et omniprésente sans aucune explication physiopathologique, sur une période d'au moins six mois (21, 25). Un moindre effort, physique, mental et même émotionnel peut induire un état de fatigue "handicapant" (29). Néanmoins, un certain nombre de conditions médicales peuvent être à l'origine de ce dénominateur commun, par exemple la fatigue liée aux cancers (30, 31). De plus, une revue systématique de la littérature indique qu'il s'agit de l'un des symptômes les plus signalés par les individus exposés à une vaste gamme de maladies et elle peut avoir différentes formes, aiguë ou chronique (32). De ce fait, au moins quatre des huit symptômes secondaires rhumatologiques ou/et neuropsychiatriques, mentionnés dans le tableau 1, doivent accompagner la fatigue, une composante majeure mais difficilement mesurable (33). Cet épuisement a des retentissements sur les activités quotidiennes des personnes qui en sont atteintes et est accompagné de divers problèmes, notamment socio-professionnel (2, 17).

La douleur liée à l'encéphalomyélite myalgique

La douleur se définit comme étant une sensation désagréable, ressentie par un individu soit au niveau d'une zone précise ou diffuse, associée à une altération présente ou potentielle. L'intensité de la douleur est très variable, allant de modérée à intolérable, selon le seuil de tolérance de la personne (34). La douleur perçue par les patients atteints d'encéphalomyélite myalgique, telle que des maux de tête, des douleurs musculaires et/ou articulaires constitue l'un des principaux symptômes secondaires (35, 36). Les myalgies sont évolutives. Au début de la maladie, celles-ci sont plus localisées puis la douleur se généralise et s'intensifie. Toutefois, il peut y avoir des variations d'intensité, soit une diminution ou dans le pire des cas un pic d'augmentation. Ces sensations douloureuses sont accompagnées de faiblesses musculaires, de baisse d'endurance et bien sûr d'énergie, ce qui limite toute activité (16, 37).

Les troubles du sommeil

Les troubles du sommeil peuvent avoir différentes formes, par exemple l'insomnie ou encore l'hypersomnie. Lorsque les troubles du sommeil perdurent, cela peut affecter le bien-être physique et mental de l'individu (38-40). Les troubles du sommeil (insomnies, sommeil agité...) occupent une place majeure dans la vie des patients EM, ce qui entraîne des nuits non réparatrices (27, 38, 39). Tout comme les autres symptômes, celui-ci altère également la qualité de vie de ses individus, mais en plus, contribue au développement d'autres problèmes, par exemple la nervosité et les troubles de la mémoire (40-42).

Le malaise après l'effort

Le malaise après l'effort (*post-exertional malaise* ou PEM) est l'un des symptômes caractérisant l'encéphalomyélite myalgique et l'une des principales causes qui limite l'exercice physique. Suite à un effort physique ou mental, les patients EM peuvent voir leur état de santé se détériorer d'avantage, accompagné d'une aggravation des symptômes (27, 43, 44). Ce changement d'état peut durer 24 heures ou plus. Néanmoins suite à un

effort, les effets sont variables d'un individu à un autre (45, 46). Le malaise après l'effort porte atteinte aux capacités fonctionnelles des patients. L'évaluation du malaise après l'effort se base sur l'auto-déclaration des patients, néanmoins chaque individu perçoit les symptômes différemment (45, 47, 48).

Différents tests d'exercice ont été établis afin d'estimer la condition physique des personnes atteintes d'EM (PAEM) (43). L'épreuve d'effort consiste à pédaler sur un vélo fixé ou encore à marcher sur un tapis roulant et le rythme cardiaque du participant est enregistré. Néanmoins, il a été rapporté que les résultats diffèrent selon le matériel utilisé (43, 49). La mesure de différents paramètres de la fonction autonome, notamment la fréquence cardiaque qui est l'un des meilleurs indicateurs pour évaluer la tolérance à l'exercice physique, a été relevée chez les PAEM comparativement aux sujets sains sédentaires (50). Ses données présentaient des différences significatives (49, 50). Cette approche fournit des informations sur la sévérité du PEM.

McManimen SL, et *al.*, ont énuméré une méthode couramment utilisée pour évaluer la capacité physique des patients, l'auto-déclaration via différents questionnaires (44).

D'autres symptômes ressentis par les patients, font partis du tableau clinique de l'encéphalomyélite myalgique. Ils peuvent varier en intensité et en nombre selon l'individu (51). Certaines manifestations secondaires sont énumérées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2. Variété de symptômes mentionnée par les patients EM

Symptômes et systèmes associés	
Symptômes associés au système immunitaire	Ganglions cervicaux et/ou axillaires douloureux Maux de gorge Hypersensibilités vis-à-vis des aliments, médicaments, et/ou aux produits chimiques symptômes grippaux récurrents
Symptômes du système nerveux central	Troubles de la mémoire et/ou de la concentration Dépression Anxiété

Symptômes du système nerveux autonome	Intolérance orthostatique Palpitations cardiaques, vertiges, tachycardie, nausée Syndrome du côlon irritable Dysfonction de la vessie, fréquence urinaire
Symptômes neuroendocriniens	Tolérance au stress réduite Variation du poids Intolérance au chaud et/ou froid
Perturbations au niveau du système digestif	Problèmes de digestion Douleurs abdominales Gaz, ballonnements Nausées, constipation, diarrhées Côlon irritable

Ce tableau regroupe un ensemble de manifestations associé à différents systèmes de l'organisme. Les symptômes peuvent se présenter de façon continue ou encore alternée avec des phases de rémission suivies de rechute, comme cela a été témoigné par les participants de notre étude.

4.2 Diagnostic différentiel

4.2.1 Diagnostic clinique établi par les praticiens

L'évaluation de l'encéphalomyélite myalgique est difficile car les médecins doivent caractériser au moins quatre symptômes en se référant aux critères caractéristiques (Fukuda K, 1994) d'autant plus qu'aucun test biologique n'existe (20). En effet, les patients peuvent présenter les symptômes de cette maladie pendant de nombreuses années avant qu'elle ne soit diagnostiquée. Chez l'adulte, on considère qu'une fatigue inexplicée et chronique, qui dure plus de 6 mois, est un symptôme cardinal (25, 28). Or chez un enfant, cette fatigue accablante doit perdurer au moins 3 mois (52). De nombreuses pathologies chroniques et affections telles que la fibromyalgie, le lupus érythémateux disséminé, la maladie de Lyme, l'hépatite B ou C, la maladie cœliaque, l'hypothyroïdie mais aussi une anémie et bien d'autres, peuvent provoquer ces multiples symptômes, ce qui porte à confusion (25, 44). De ce fait, le diagnostic de l'EM se base également sur l'élimination de maladies présentant des similitudes au niveau des symptômes (27).

Dans une seconde étape, des tests physiques et des examens médicaux (analyses sanguines, examen neurologique...) sont effectués chez les patients afin de confirmer le diagnostic et essayer d'identifier les facteurs sous-jacents, notamment associés à une éventuelle infection par exemple (11). La prise en charge et les traitements proposés aux sujets malades se déterminent à la lumière de leurs résultats d'analyses médicales.

4.2.2 Questionnaires

Étant donné les difficultés rencontrées lors du diagnostic de l'encéphalomyélite myalgique, de nombreuses études, y compris la nôtre, ont examiné la cohérence des réponses des patients à partir de questionnaires standardisés. Le portrait clinique du patient ne permet pas l'identification exacte et précise de ce syndrome. Il en résulte beaucoup d'incertitude

quant à savoir que la fibromyalgie est un syndrome similaire, avec des taux de comorbidité très variables selon les différentes études (17, 35, 44). McManimen SL, et *al.*, ont mené une enquête afin de distinguer deux groupes de patients, l'un touché par le syndrome de fatigue chronique et l'autre présentant cette même pathologie associée à la fibromyalgie, en utilisant un questionnaire revisité établi à partir de plusieurs, notamment le DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) (44).

Les trois questionnaires (DePaul Symptom Questionnaire, RAND SF-36 et Multidimensional Fatigue Inventory-20) décrits ci-dessous se trouvent en annexe (1, 2 et 3).

DSQ (DePaul Symptom Questionnaire)

En 2010, le professeur Leonard Jason a développé le questionnaire « The DePaul Symptom Questionnaire, DSQ » afin évaluer les différents symptômes de la pathologie en se basant sur les critères de Fukuda (1994) (9, 53). Le questionnaire DSQ, composé de 99 items, interroge les individus sur les aspects suivants : démographique, symptomatologie, antécédents médicaux et vie socio-professionnelle. En ce qui concerne l'évaluation des symptômes (questions 13 à 66), les répondants doivent indiquer sur une échelle allant de 0 à 4 la fréquence et la sévérité de leurs symptômes au cours des 6 derniers mois. Il s'agit d'une période jugée optimale vu l'évolution graduelle de la maladie au cours du temps chez certains cas (54).

SF-36 (Medical Outcome Study Short Form 36 item Health Survey)

Dans différentes enquêtes sur la santé, le questionnaire SF-36, contenant une série de 36 questions, est largement utilisée. Cette échelle d'auto-évaluation mesure huit concepts de la qualité de vie : (1) le fonctionnement physique, (2) la limitation physique, (3) la douleur physique, (4) la perception de la santé générale, (5) la vitalité (énergie – fatigue), (6) le fonctionnement social, (7) la limitation émotionnelle, et (8) la santé mentale. Une note est attribuée en fonction des différentes réponses puis cette dernière sera transformée en un score variant de 0 à 100 (un score de 100 indiquant une meilleure qualité de vie et inversement 0 une douleur corporelle). La moyenne des dimensions 1, 2, 3 et 4 donnera un score physique et la moyenne du groupe 5, 6, 7 et 8 indiquera un score mental (54, 55).

MFI (Multidimensional Fatigue Inventory-20)

Le questionnaire MFI évalue différentes facettes de l'EM, telles que : la fatigue (générale, physique et morale), l'activité réduite et la motivation des individus (56). Cet instrument d'auto-évaluation de la fatigue regroupe 20 items. Chacun de ses 20 éléments contient cinq choix de réponse (échelle de 1 à 5) et les répondants sont invités à cocher l'affirmation qui correspond le mieux à leur état au cours des deux semaines précédant l'évaluation (54, 57).

L'évaluation des données de l'auto-déclaration des patients atteints d'EM via les différents questionnaires peut aider à confirmer le diagnostic de la pathologie. De plus, dans les études de recherche, une différenciation des sujets malades par rapport des témoins a pu être mise en évidence.

5. Étiologie et physio-pathogenèse

Malgré les efforts des acteurs de la recherche, les mécanismes physiopathologiques de l'encéphalomyélite myalgique restent encore méconnus, tout comme son étiologie (11, 58). Une foule d'études exploratoires s'est orientée sur divers facteurs, différents systèmes de l'organisme dans le but d'identifier des anomalies chez les individus souffrant d'encéphalomyélite myalgique (9).

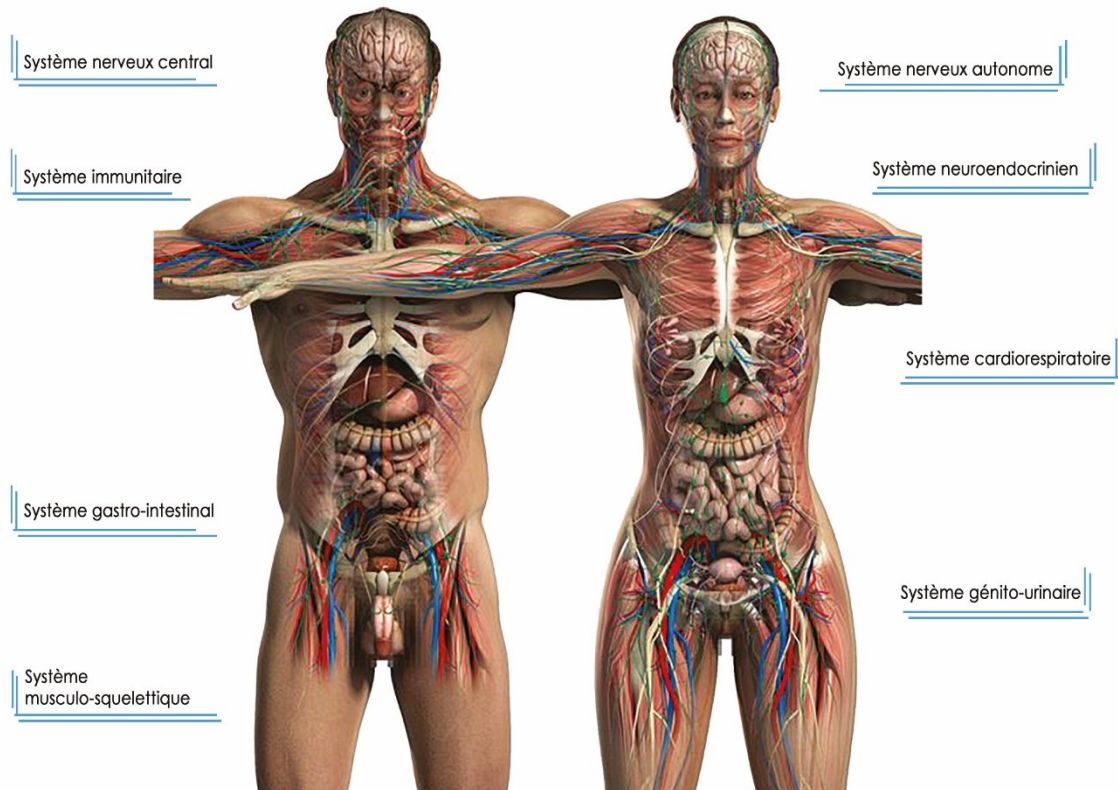


Figure 2. Représentation schématique du corps humain et des principaux systèmes perturbés chez les personnes atteintes d'encéphalomyélite myalgique

Plusieurs systèmes du corps humain sont perturbés et les nombreux troubles évoqués au cours de cette pathologie y sont rattachés. Figure adaptée de <https://www.pinterest.fr/pin/538039486707399817/>

Les différents résultats expérimentaux suggèrent que ce syndrome, qui apparaît sous forme familiale ou sporadique, pourrait être déclenché par un grand nombre de facteurs (infections, réactions immunitaires, exposition à des toxines environnementales, insomnie chronique, dérèglement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, prédisposition génétique...) (59). L'état des connaissances actuel n'indique pas une piste unique mais plutôt une dérégulation multi-systémique (60). Dans cette section, nous présenterons les principales pistes de recherche et certaines anomalies mentionnées chez les patients atteints d'EM. Il faut retenir que : (i) nous ne savons pas si ses altérations sont la cause du développement de cette affection et/ou plutôt l'une de ses conséquences, (ii) la plupart des

études présente une cohorte de petite taille, ce qui peut être une limitation qui est souvent aggravée par l'hétérogénéité de la maladie.

Développement post-infectieux : l'une des premières explorations

Certains patients étaient en bonne santé, tandis que d'autres ont été, précédemment, infectés soit par des bactéries, des parasites ou encore par des virus, notamment le virus d'Epstein-Barr (EBV) (61-63). Il existe un grand nombre de microbes identifiés chez des patients souffrant d'EM (61). Certains de ses agents infectieux, ayant un potentiel effet causal sur l'EM, sont énumérés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3. Diversité des agents infectieux associés à l'encéphalomyélite myalgique

<i>Agents infectieux d'origine virale</i>	Herpès virus : Virus d'Epstein-Barr, Cytomégalovirus (CMV), Virus herpétique humain de type six (VHH-6)
	Entérovirus : Virus coxsackie B (VCB), échovirus (EV)
	Parvovirus B19 (PB19)
<i>Agents infectieux d'origine bactérienne</i>	Borrelia (responsable de la maladie de Lyme)
<i>Agents infectieux d'origine parasitaire</i>	Giardia lamblia, Blastocystishomonis (Parasites protozoaires intestinaux provoquant le syndrome du côlon irritable) Coxiellaburnetii

Tous les agents pathogènes suspectés ont une corrélation avec l'EM :

- Des taux élevés d'anticorps dirigés contre ses agents infectieux ont été retrouvés dans le sang de patients atteints d'EM (64)
- Ils peuvent occasionner des symptômes retrouvés chez les sujets atteints d'EM (65)

Néanmoins, aucune preuve scientifique n'a permis de confirmer cette hypothèse infectieuse.

Sur cette piste infectieuse, Straus SE, et ses collaborateurs ont tenté d'évaluer l'efficacité d'un traitement antiviral. Ce médicament, à base d'acyclovir, n'a pas eu plus de succès que le placebo (66). Néanmoins, la lutte contre un agent infectieux, en utilisant un traitement antiviral, peut s'avérer inefficace si le virus est inactif. Toutefois, une autre étude a montré l'efficacité du valacyclovir délivré à un sous-groupe de patients atteints d'EM et qui ont été infectés intérieurement par l'EBV (62, 67). Or, face à une faiblesse du système immunitaire, ces micro-organismes présents à un état latent, peuvent se réactiver. De ce fait, une infection virale active (ou réactivée) peut provoquer des réponses immunitaires anormales, ainsi des réactions immunologiques peuvent persister dans l'organisme même après que le patient soit guéri. Sur le plan clinique, une mauvaise régulation du système immunitaire peut engendrer un manque d'énergie mais également une fatigue chronique.

Anomalies immunologiques

L'implication du système immunitaire dans la pathogenèse de l'EM a suscité une grande curiosité car ce système est la première ligne de défense utilisée par le corps humain face aux infections. De nombreuses études ont rapporté la présence d'anomalies immunitaires chez les sujets souffrants d'encéphalomyélite myalgique (59, 68). "*Chronic Fatigue and Immune Dysfunction Syndrome*" est l'une des appellations de cette pathologie, faisant allusion à l'ensemble de ses perturbations rencontrées au niveau du système de défense (11). Les altérations fréquemment retrouvées chez les sujets malades seront mentionnées ci-dessous.

Principalement, des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (interleukin-1, TNF- α , NF- κ B) ont été observés, ce qui suggère la pénétration ou la prolifération d'un corps étranger dans l'organisme (69, 70). Il existe des évidences abondantes soulignant la forte production de ces messagers du système immunitaire (68). Les cytokines pro-inflammatoires ont une fonction importante dans l'inflammation en provoquant des symptômes classiques qui sont également associés à l'EM, notamment la fièvre, des douleurs musculaires, la fatigue (70). Bien qu'un excès de cytokines ait été rapporté chez des patients souffrant d'EM, les résultats sont controversés (70). La variabilité des cytokines, l'hétérogénéité des cohortes étudiées induisent des incohérences dans l'interprétation des différents résultats, ce qui suggère qu'une stratification des groupes de

patients devrait s'effectuer sur différents paramètres (exemples : symptomatologiques, biochimiques, immunologiques...).

D'autres observations, au niveau du système de défense de l'organisme, indiquent une réduction de l'activité des cellules tueuses naturelles également appelées lymphocytes NK pour *Natural Killer* chez les individus malades comparés aux témoins (68).

Des perturbations furent notées au niveau de la production des anticorps ainsi que chez les lymphocytes T, destinés à assurer une réponse cellulaire (71). Différentes études ont remarqué une augmentation du taux d'immunoglobulines chez certains patients atteints d'EM (60).

Néanmoins, suite à ces infections, le système immunitaire peut être perturbé, ce qui augmenterait la vulnérabilité des individus face à différentes pathologies, sans exclure le syndrome de fatigue chronique (72). De nombreuses équipes à travers le monde ont tenté d'identifier le ou les facteurs qui pourrait être mis en cause dans l'encéphalomyélite myalgique (60). Nous pouvons également mentionner d'autres pistes investiguées: des dysfonctionnements musculaires, des anomalies cardiovasculaires, des troubles neuroendocriniens, métaboliques et métaboliques, une dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif. Des facteurs environnementaux, tels que les polluants toxiques (par exemple: organophosphorés, pyréthrinoïdes, pesticides organochlorés...) affectent l'organisme, mais aussi peuvent influencer le développement de la maladie (60).

Sur le plan scientifique, ses hypothèses étiologiques restent non prouvées (60, 73). Les principales hypothèses relativement associées aux causes potentielles mentionnées ci-dessus, sont controversées (74). Ainsi, ses multiples éléments apportés soulignent l'hétérogénéité de cette pathologie.

Composante génétique

Des nombreuses études démontrent qu'une composante génétique peut jouer un rôle dans le développement de l'encéphalomyélite myalgique (75-77). Afin de mettre en évidence l'existence d'une composante génétique et aussi environnementale dans cette maladie, des recherches se sont portées sur des paires de jumeaux et des familles.

En effet, plusieurs études ont démontré que des membres d'une famille de patients souffrants d'EM semblent être plus prédisposés à développer cette maladie, ce qui sous-entend que l'incidence est plus élevée au sein de ses familles (75, 76).

Une étude sur des couples de jumeaux, a montré un taux de concordance pour une fatigue chronique quel que soit la définition utilisée ($n=3$), étaient supérieurs chez des jumeaux monozygotes (MZ) en les comparant avec ceux observés avec des jumeaux dizygotes (DZ). La comparaison des taux de concordance pour chacune des trois définitions a indiqué : (A) une fatigue qui dure plus de six mois, 42% pour les jumeaux (MZ) et 30% pour ceux dizygotes; (B) une fatigue inexplicée et qui n'est pas attribuable aux critères d'exclusion, 39% (MZ) vs 21% (DZ); (C) une fatigue chronique qui n'est pas causée par des conditions médicales et psychiatriques, 38% (MZ) vs 11% (DZ). Cela suggère la contribution de facteurs génétiques dans l'étiologie de ce syndrome (77).

Une étude similaire utilisant les données du Registre des jumeaux australiens a démontré que la fatigue, composante majeure de ce syndrome, a une influence génétique et que l'incidence est plus élevée chez les vrais jumeaux identiques par rapport aux couples de jumeaux DZ (76).

De plus, des études ont également démontré que l'anxiété, la dépression et la fatigue chronique, des manifestations rencontrées chez des patients souffrant d'EM, semblent avoir une co-variation génétique (78).

Plusieurs études ont identifié des variations génétiques dans différents gènes principalement impliqués dans des voies de signalisation présentant des dysfonctionnements chez les patients EM, notamment dans la réponse immunitaire, l'inflammation, les mécanismes neuronaux, la fonction mitochondriale (79, 80).

Schlauch et ses collaborateurs ont effectué une analyse d'association du génome (GWAS, Genome-Wide Association Study) chez 42 patients atteints d'EM. Ils ont identifié 23 polymorphismes fortement associés à la pathologie ($P < 10^{-10}$). Le SNP rs12235235 localisé dans le gène RECK (Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs) avait la plus forte association ($P = 5.76 \times 10^{-16}$). Cependant, aucune étude n'a été

portée sur la caractérisation de ce gène, de ce fait sa fonction est inconnue dans le contexte de l'EM (81).

Par une approche génomique fonctionnelle, Smith et *al.*, ont suggéré que deux nouveaux gènes, GRIK2 et NPAS2, sont potentiellement associés à ce syndrome. Ces deux gènes candidats sont respectivement impliqués dans la neurotransmission glutamatergique et le rythme circadien. De manière générale, c'est deux voies présentent des dérégulations chez les patients atteints d'encéphalomyélite myalgique (82).

Composante épigénétique

Afin d'étudier la contribution des petits ARNs non codants dans l'encéphalomyélite myalgique et plus précisément les microARNs, compte tenu de leur rôle dans de nombreux processus biologiques, des études ont examiné leur profil d'expression chez des patients EM. En effet, les microARNs ont la capacité de moduler l'expression génique en se liant sur les ARN messagers (83, 84).

Brenu et ses collaborateurs, ont identifié neufs microARNs provenant des lymphocytes NK et CD8⁺ de patients EM : le miR-21 était sous-exprimé dans les deux types cellulaires et l'expression des miR-17-5p, miR10a, miR-103, miR152, miR-146a, miR-106, miR-223 et miR-191 était diminuée dans les cellules NK des patients EM lorsqu'ils les ont comparés aux mêmes types cellulaires obtenus de sujets témoins (85).

Cette équipe australienne a, par la suite, identifié 19 microARNs circulants qui présentaient une expression différentielle dans le plasma de patients EM en comparaison avec des sujets sains, parmi lesquels trois d'entre eux (miR-127-3p, miR-142-5p et miR-143-3p) ont été validé par q-RT-PCR (86).

B. L'homocystéine : un facteur de risque indépendant

1. Métabolisme de l'homocystéine et les formes circulantes

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré, intermédiaire de deux voies métaboliques : la reméthylation et la trans-sulfuration (Figure 3).

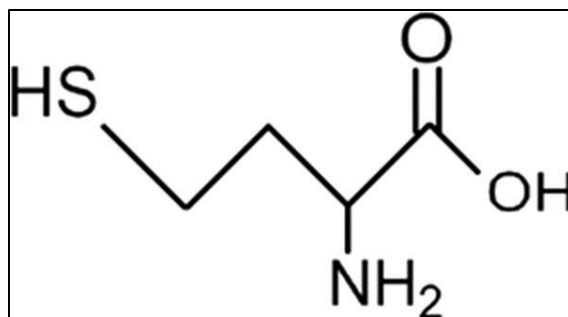


Figure 3. Structure de l'homocystéine (87)

Figure adaptée de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4326479/>

La synthèse de l'homocystéine se fait à partir de la méthionine, l'un des acides aminés essentiels ayant un rôle constitutif dans la synthèse protéique. Cette dernière, d'origine alimentaire, est absorbée au niveau de la muqueuse intestinale par le biais d'un transporteur membranaire (88). Par un processus de trans-méthylation, la méthionine est catabolisée en S-adénosylméthionine (SAM) puis en S-adénosylhomocystéine (SAH) impliquant différentes isoformes de la méthionine adénosyltransférase et une méthyltransférase respectivement (89, 90). Dans cette voie métabolique, la dernière étape de ce transfert de méthyle convertit le SAH en homocystéine par l'intervention de la S-adénosylhomocystéine hydrolase (AHCY ou SAHH) (88).

- En cas de déficit au niveau de la méthionine, la reméthylation de l'Hcy en méthionine est catalysée par la méthionine synthétase (MS) avec l'assistance de son cofacteur, la vitamine B12 (méthylcobalamine). Le métabolisme du folate fournit le groupement méthyl transféré lors de l'action de la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) en présence la vitamine B6. Dans le foie et dans les reins, la réaction de reméthylation de l'homocystéine peut se produire grâce la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) (90).
- La voie de trans-sulfuration irréversible de l'Hcy est favorisée dans deux conditions : une saturation de la voie précédente ou un manque de cystéine. Dans ce cas, la cystathionine-bêta-synthétase (CBS) convertit l'Hcy en cystathionine en présence de son cofacteur vitaminique, la vitamine B6 et la transformation de ce produit en cystéine est effectuée par la cystathionine gamma-lyase (CTH) (89). La

cystéine, un précurseur de biomolécules soufrées, s'engagera dans divers processus biologiques notamment la synthèse protéique et la biogenèse du glutathion (91).

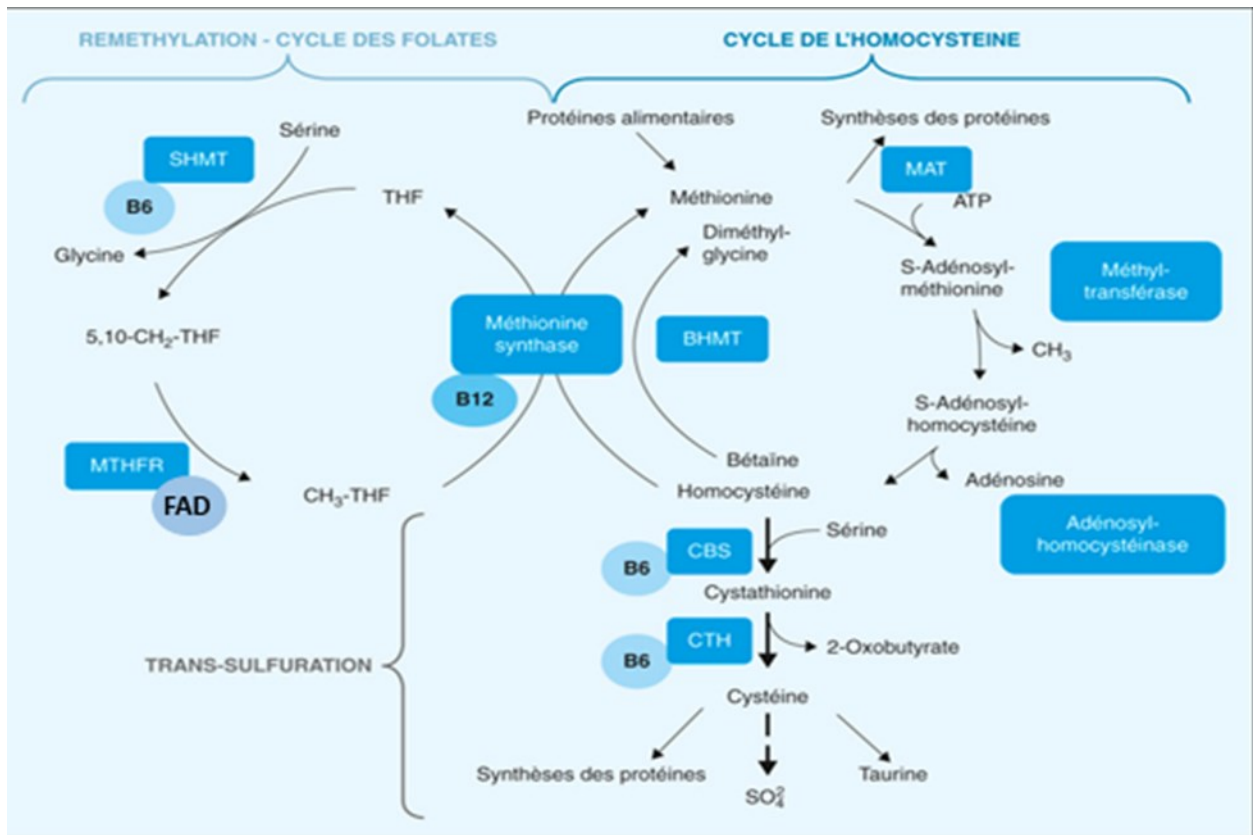


Figure 4. Représentation schématique du métabolisme de la méthionine - homocystéine.

BHMT : bétaine-homocystéine méthyltransférase; CBS : cystathionine synthase; CTH : cystathionine gamma-lyase; FAD : Flavine adénine dinucléotide; MAT : méthionine adénosyltransférase; MTHFR : 5-10 méthylène-tétrahydrofolate réductase; SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase; B2, B6, B12 : vitamines B2, B6 (pyridoxine) et B12 (cobalamine); THF : tétrahydrofolate.

Figure adaptée de http://www.jle.com/fr/revues/abc/e-docs/exploration_dune_hyperhomocysteinemie_298176/article.phtml?tab=images

Le métabolisme du carbone va intégrer les voies de trans-sulfuration et de reméthylation, associées au cycle des folates. L'homocystéine est un métabolite intermédiaire de ce métabolisme et est impliqué dans de multiples processus (90).

Les cofacteurs vitaminiques :

Le trio vitaminique, la pyridoxine (B6), cobalamine (B12) et l'acide folique ou folate (B9), provient de l'alimentation (92, 93). Comme indiqué ci-dessous, ils sont impliqués dans la voie métabolique de la méthionine et de l'homocystéine et y jouent un rôle de cofacteur.

La vitamine B6, appelée aussi pyridoxine, est impliquée dans différents métabolismes, notamment des acides aminés et des lipides (92). Dans le métabolisme de l'homocystéine, la forme pyridoxal-5'-phosphate est sollicitée en tant que cofacteur de la cystathionine synthase et de la cystathionase (réactions de trans-sulfuration) (92).

La vitamine B12, hydrosoluble, se présente sous plusieurs formes dans l'organisme. Toutefois il s'agit de la méthylcobalamine qui est nécessaire pour la reméthylation de l'homocystéine (94). Lors de l'absorption intestinale des vitamines, des protéines sont mises en jeu. En ce qui concerne la cobalamine, une fois complexée au facteur intrinsèque (FI), elle peut franchir la paroi du tube digestif, au niveau de l'iléon en se fixant sur son récepteur, la cubiline. Cette dernière est codée par le gène CUBN, et en cas de défaillance enzymatique, nous observons une malabsorption de la vitamine B12 ce qui peut engendrer une anémie pernicieuse (88, 94).

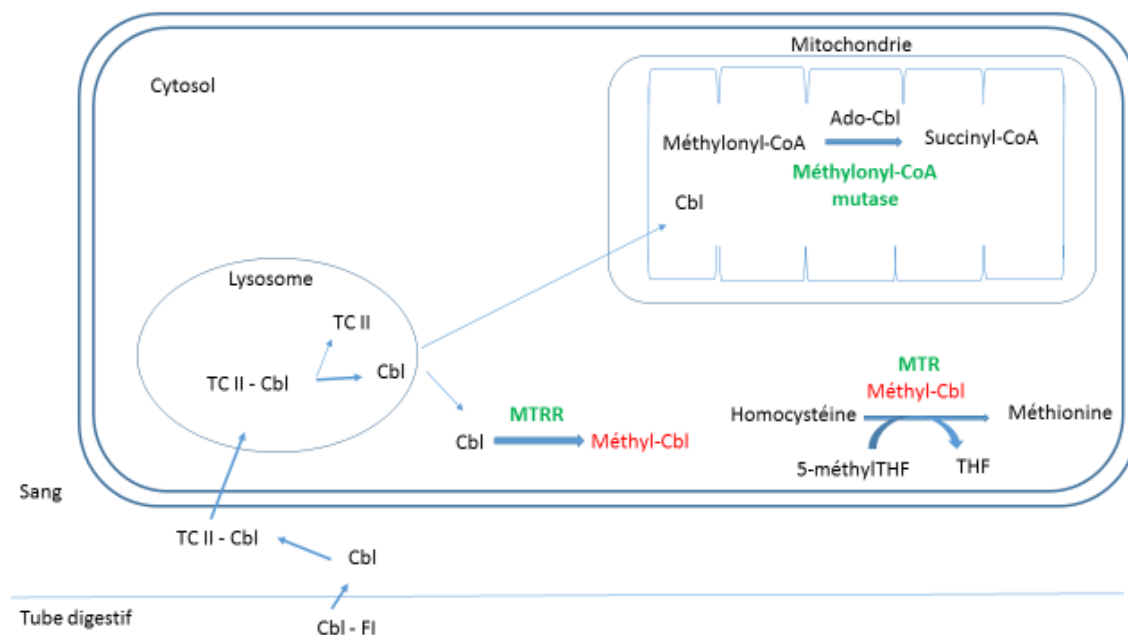


Figure 5. Représentation schématique du métabolisme cellulaire de la vitamine B12 (cobalamine).

FI : facteur intrinsèque; complexe TC – Cbl : holo-transcobalamine; Cbl: vitamine B12 ou cobalamine; méthyl-Cbl : méthyl-cobalamine; MTR : méthionine synthase ; MTRR : méthionine synthase réductase; Ado-Cbl: adénosyl-cobalamine

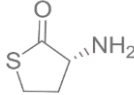
L'adénosylcobalamine et la méthylcobalamine sont deux formes actives de la vitamine B12. La méthionine synthase (MTR ou MS) utilise la méthylcobalamine comme coenzyme lors de la conversion de l'homocystéine en méthionine.

La famille « folate » ou vitamine B9 regroupe plusieurs molécules et dérivés que nous pouvons classer en deux sous-groupes du fait de la présence du nombre de molécules d'acide glutamique via des liaisons γ -peptidiques: folate “monoglutamate”, forme pouvant être absorbée au niveau de la muqueuse intestinale, et folate “polyglutamate”, qui devra être hydrolysée dans une version avec un seul glutamate. Notons que les folates polyglutamates correspondent à la forme majoritaire retrouvée dans les aliments, soit environ 90%. Les formes “monoglutamates”, y compris l'acide folique, peuvent être apportées directement à l'organisme à travers des suppléments. La vitamine B9 est impliquée dans de nombreuses réactions biochimiques. La dihydrofolate réductase, comme son nom l'indique, réduit ses molécules ayant un unique glutamate en tétrahydrofolate (THF) puis elles s'incorporent dans le cycle folate (Figure 4) (95, 96).

L'homocystéine plasmatique

Plusieurs formes d'homocystéine circulent dans le plasma, soit sous forme libre ou associée à des protéines par une liaison peptidique ou par l'intermédiaire de ponts disulfures (Tableau 4) (97).

Tableau 4: Les différentes formes d'homocystéine plasmatique

<i>Homocystéine plasmatique totale (tHcy)</i>			
Forme libre	Réduite (minoritaire)	L-homocystéine $\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	1%
	Oxydée (majoritaire)	L-homocystéine-homocystéine $\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \qquad \qquad \text{NH}_3^+ \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{HC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{COO}^- \qquad \qquad \text{COO}^- \end{array}$	5 – 10%
		L-homocystéine-cystéine $\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \qquad \qquad \text{NH}_3^+ \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{HC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{COO}^- \qquad \qquad \text{COO}^- \end{array}$	5 – 10%
		L-homocystéinethiolactone 	
Forme liée aux protéines		$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{Protéine-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ (pontdisulfure) $\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{Protéine-NH-CO-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH} \end{array}$ (pontpeptidique)	80 – 90%

La concentration plasmatique de l'homocystéine totale est dite « normale », quand elle est située entre 5 et 15 $\mu\text{mol/L}$ (88, 97). Cependant, il y a une variabilité dans les valeurs considérées comme normales à travers les différentes études et leurs méthodes de dosage.

Toutefois, dans le cas d'une hypohomocystéinémie, le niveau de cette molécule soufrée dans le sang est inférieur à 6,0 $\mu\text{mol/L}$ (98). Une diminution de la quantité d'homocystéine induit, de ce fait, une plus faible production de glutathion, un anti-oxydant cellulaire majeur (90, 91).

2. Caractéristiques d'une hyperhomocystéinémie

L'élévation des niveaux d'homocystéine dans la circulation sanguine, aussi appelée hyperhomocystéinémie (HHcy), peut être causée par de nombreux facteurs, notamment, nutritionnels, génétiques ou encore iatrogéniques (i.e. causés par certaines médications) (90, 99). Il a été suggéré que l'hyperhomocystéinémie peut être associée à différentes pathologies (90, 91, 99). Selon les différents niveaux de concentration élevée de l'homocystéine plasmatique, trois formes d'hyperhomocystéinémie sont distinguées: hyperhomocystéinémie modérée, intermédiaire et sévère (88, 97).

Tableau 5: Les valeurs normales et pathologiques de l'homocystéine plasmatique

Formes	Concentration de l'homocystéine ($\mu\text{mol/L}$)
Normale	5 – 15 $\mu\text{mol/L}$
Souhaitable	< 12 $\mu\text{mol/L}$
Hypohomocystéinémie	< 6 $\mu\text{mol/L}$
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 30 $\mu\text{mol/L}$
Intermédiaire	30-100 $\mu\text{mol/L}$
Sévère	>100 $\mu\text{mol/L}$

2.1 Facteurs favorisant une élévation de l'homocystéine dans le sang

Le métabolisme intracellulaire régulant les niveaux d'homocystéine (Hcy) est habituellement bien régulé et sa concentration dans le plasma devrait être $< 12 \mu\text{mol/L}$ (Tableau 5). Les variations dans les niveaux sanguins et urinaires en homocystéine sont possiblement causées par des changements environnementaux, notamment au niveau de la diète. Cependant des carences dans certains micronutriments comme le folate, la vitamine B12 et la vitamine B6 altèrent le métabolisme de l'Hcy augmentant ainsi ses niveaux intra- et extracellulaires. Outre la contribution de ces micronutriments, des polymorphismes au niveau de certains gènes impliqués dans cette voie métabolique peuvent aussi moduler les niveaux circulants en Hcy.

Facteurs environnementaux

Facteurs nutritionnels

Un manque de cofacteurs vitaminiques, en particulier les vitamines B6, B12 et le folate peut engendrer une hyperhomocystéinémie (93). Plusieurs études ont mis en évidence la corrélation négative entre le niveau accru en homocystéine circulant et les carences dans ces facteurs nutritionnels.

Les enzymes CBS et CTH utilisent la vitamine B6 comme cofacteur dans la voie de trans-sulfuration et les produits obtenus sont respectivement : la cystathionine et la cystéine (Figure 4). De ce fait, des déséquilibres vitaminiques vont nuire à l'activité de ses protéines dotées de propriétés catalytiques et affecter l'organisme et, notamment conduire à une anémie, des problèmes neurologiques en cas de carences en vitamines B12, une hyperhomocystéinémie et d'autres désordres (99). L'évaluation du taux plasmatique en homocystéine est un indicateur de la carence de ces vitamines (100).

Causes iatrogéniques

Différents médicaments présentent un mode d'action qui affecte les niveaux d'homocystéine. Certains peuvent induire une augmentation tandis que d'autres sont

associés à une diminution de son taux. Le tableau ci-dessous présente une liste non exhaustive de médicaments influençant la synthèse d'homocystéine.

Tableau 6. Des médicaments appartenant à la classe d'agents immunosuppresseurs pouvant affecter les niveaux d'homocystéine

Noms des médicaments	Mode d'action	Conséquences	Références
Carbamazépine	Ils interfèrent avec l'absorption du folate, des vitamines B6 et/ou B12	augmentation du niveau d'Hcy	(101)
Cyclosporine			(102, 103)
Azathioprine			(103)

De nombreuses études ont suggéré que certains traitements peuvent potentiellement affecter les niveaux d'Hcy (101-103). Prenons l'exemple la cyclosporine, son association avec l'hyperhomocystéinémie modérée reste controversée (104). Dans notre étude, nous avons pris le soin d'établir la liste des traitements de chacun de patients de notre projet d'étude afin d'exclure la cause de la médication sur les concentrations anormales de l'Hcy.

Association avec différentes pathologies

Le métabolisme de l'homocystéine a été lié à différents états pathologiques tels que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, les anomalies congénitales, l'athérosclérose et bien d'autres (99). Prenons l'exemple des maladies cardio-vasculaires où le métabolisme de l'homocystéine a toute son importance dans l'initiation ou l'aggravation de ces maladies. Le risque attribuable à l'hyperhomocystéinémie est près de 25%, et est de ce fait en concurrence avec les autres facteurs de risque bien connus, notamment le tabagisme.

La dépression, l'anxiété ou encore des troubles neurocognitifs ont été associés à une élévation en homocystéine plasmatique (105, 106).

Des niveaux élevés en homocystéine ont également été rapportés chez des personnes souffrantes de maladies inflammatoires de l'intestin, notamment la maladie de Crohn (107). D'ailleurs, la perturbation du microbiome intestinal des patients EM, a été observée

suite à une augmentation de l'homocystéine dans les travaux de Shukla SK et *al.* (2015) (108).

L'établissement de la relation entre l'encéphalomyélite myalgique et une élévation de l'homocystéine proviennent, dans un premier temps, des travaux de Regland B et *al.* 1997 qui ont mis en évidence dans une petite cohorte de patients (n=12) un taux élevé en homocystéine dans le liquide-céphalo-rachidien (LCR) de femmes atteints de fibromyalgie et d'EM comparé aux témoins, sans toutefois observer de changement au niveau plasmatique. Toutefois, les mécanismes sous-jacents à cet effet au niveau du LCR restent inconnus (109). Cependant, l'homocystéine n'est pas un biomarqueur spécifique lié à l'encéphalomyélite myalgique puisqu'une hyperhomocystéinémie peut coexister chez des patients présentant différentes pathologies.

Un nombre limité d'études permettent d'associer les différents symptômes de l'EM avec une augmentation de l'homocystéine plasmatique. Cependant, certaines recherches soutiennent cette idée indirectement.

Une fatigue inhabituelle qui perdure est l'une des manifestations cliniques les plus connues dans l'EM. Plusieurs études soulignent le lien entre l'hyperhomocystéinémie et cet épuisement. Veeranki et ses collaborateurs ont observé dans leur étude, qu'une élévation de l'homocystéine plasmatique était associée à une faiblesse et fatigue musculaire impliquant un dysfonctionnement mitochondrial et une dérégulation épigénétique médiée par des microARNs (90).

Les personnes atteintes d'EM (PAEM) indiquent avoir des troubles du sommeil, or nous savons qu'un sommeil perturbé peut influencer notre capacité intellectuelle, notre qualité de vie mais aussi le fonctionnement de notre organisme. De ce fait, ils se réveillent souvent plus fatigués. Une corrélation a été mise en évidence entre les niveaux d'Hcy et la privation de sommeil, une forme de stress, chez un modèle murin (91). En effet, après quatre jours sans sommeil, deux groupes de rats ont obtenu une période de récupération de 24h et 48h. Un autre groupe de rats resté éveillé a été euthanasié. Oliveira AC et *al.*, ont observé que les rats privés de sommeil présentaient une diminution des niveaux d'homocystéine

plasmatique. Après la période de récupération, les concentrations de l'Hcy étaient inférieures aux taux normaux. De plus, ils ont indiqué une réduction des taux de glutathion et inversement une augmentation de l'acide thiobarbiturique chez ces rats, ce qui suggère que la réduction de l'homocystéine pourrait correspondre à une réponse auto-correctrice afin de synthétiser du glutathion (91). En fait, un manque de sommeil module les niveaux d'Hcy.

Une étude effectuée dans la population chinoise a montré que l'hyperhomocystéinémie était associée à une durée de sommeil importante, soit supérieure à 9h par jour, mais également à une activité physique réduite (110).

Le cycle de la méthionine est un carrefour primordial qui se produit dans toutes les cellules et ses intermédiaires, y compris l'homocystéine, sont impliqués dans de nombreux processus biologiques, notamment au niveau de la synthèse des acides nucléiques.

Étant donné que des variants génétiques sont associés de manière significative à la présence altérée de l'homocystéine plasmatique, nous considérons qu'il y a un lien potentiel entre phénotype d'hyperhomocystéinémie et l'encéphalomyélite myalgique. Cependant, il n'y a pas d'études permettant d'associer des variants génétiques contribuant l'augmentation de l'homocystéine avec cette maladie.

Piste génétique : déficits enzymatiques

De nombreuses recherches ont été effectuées sur les prédispositions génétiques associées au phénotype hyperhomocystéinémie. Quelques polymorphismes génétiques de certaines enzymes clés du métabolisme de la méthionine sont présentés dans le tableau ci-dessous.

a. Défaillance enzymatique de la voie de reméthylation

La conversion de l'homocystéine en méthionine suite à un transfert d'un groupement méthyle provenant de la 5-méthyltétrahydrofolate, intermédiaire du cycle folate, se fait par deux enzymes : la méthionine synthase (MS/MTR) et la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT). Une altération de l'activité de ses enzymes peut donc provoquer une augmentation des niveaux de l'homocystéine (88).

Par exemple, plusieurs études ont défini des variations génétiques au sein du gène MS, rs1805087 qui sont significativement associées à des concentrations élevées en homocystéine plasmatique (88, 111).

La bétaine homocystéine méthyl-transférase (BHMT), exprimée dans les cellules hépatiques et rénales, intervient dans une voie de reméthylation alternative a également la possibilité de contribuer à une hyperhomocystéinémie, lorsque cette dernière présente une mutation génétique au sein de son gène, notamment en présence du SNP rs3733890 listé dans le Tableau 7 (88, 112).

b. Défaillance enzymatique de la voie de trans-sulfuration

La cystathionine β -synthétase (CBS) catalyse l'homocystéine et génère donc la cystathionine (88, 89). L'implication de SNP dans le gène CBS peuvent inhiber l'action de cette enzyme et induire une accumulation de son substrat (88). Les variants génétiques les plus connus sont énumérés dans le Tableau 7.

c. Défaillance enzymatique dans le cycle folate

Les polymorphismes du gène MTHFR (rs1801131 et rs1801133, respectivement appelés A1298T et MTHFR C677T) sont bien caractérisés et ont fait l'objet de plusieurs études (99, 113). De nombreuses données d'études d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont confirmé l'influence qu'ils avaient sur la libération excessive de l'homocystéine dans le liquide extracellulaire lorsque l'activité enzymatique était altérée (99). Par la suite, d'autres ont été identifiés et certains sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Principaux polymorphismes génétiques dans des gènes pour des enzymes directement ou indirectement impliquées dans la voie métabolique de la méthionine et associées au phénotype hyperhomocystéinémie.

Gène ID	Nom du gène	SNP ID	Nucléotide changé	Acide aminé changé
BHMT	bétaine-homocystéine S-méthyltransférase	rs3733890	G716A	Arg 239 Gln
CBS	cystathionine-béta-synthase	rs121964971	C1397T	Ser 466 Leu
CBS	cystathionine-béta-synthase	rs28934891	G1330A	Asp 444 Asn
CBS	cystathionine-béta-synthase	rs28934892	C1265T	Pro 422 Leu
CBS	cystathionine-béta-synthase	rs121964962	G919A	Gly 307 Ser
CBS	cystathionine-béta-synthase	rs5742905	T833C	Ile 278 Thr
MTHFR	5,10-méthylène-THF réductase	rs1801131	A1298C	Glu 429 Ala
MTHFR	5,10-méthylène-THF réductase	rs1801133	C677T	Ala 222 Val
MTHFR	5,10-méthylène-THF réductase	rs2274976	G1781A	Arg 594 Gln
MTR	méthionine synthase	rs1805087	A2756G	Asp 919 Gly
MTRR	5-méthyl-THF-homocysteine methyltransferase reductase	rs1801394	A66G	Ala 66 Gly
MTRR	5-méthyl-THF-homocysteine methyltransferase reductase	rs162036	A1049G	Lys 350 Ala
MTRR	5-méthyl-THF-homocysteine methyltransferase reductase	rs2287780	C1243T	Arg 415 Thr
MTRR	5-méthyl-THF-homocysteine methyltransferase reductase	rs10380	C1783T	His 595 Tyr
TCN2	Transcobalamine 2	rs1801198	C776G	Arg 259 Pro

Des variants génétiques, dans des gènes codants des transporteurs de vitamines, peuvent affecter la biodisponibilité des vitamines et de ce fait, avoir un impact sur les concentrations en homocystéine (99).

2.2 Conséquences de l'hyperhomocystéinémie

De nombreux travaux indiquent qu'une hyperhomocystéinémie aboutit à une élévation de SAM (S-Adenosyl methionine), ce qui stimule l'activité des méthyltransférases (DNMT) (89, 114). Par conséquent l'ADN sera hyperméthylé, ce qui peut entraîner une inactivation ou atténuation de l'expression génique (114). Sur le plan clinique, l'hyperhomocystéinémie peut être une cause indirecte de l'accident vasculaire cérébral (AVC), ou encore associée à des conditions neurologiques telles que la démence (99, 114). Au niveau cellulaire, les expériences de Werstuck GH, et *al*, réalisées *in vitro* montrent que l'augmentation de l'homocystéine induit un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE), ce qui provoque par la suite, l'augmentation de l'expression des gènes responsables de la biosynthèse du cholestérol et des triglycérides (115). Le RE est le site de synthèse et principal lieu de maturation des protéines transmembranaires et des protéines sécrétées.

Veeranki et ses collaborateurs présentent dans leur revue différentes maladies qui sont causées par une élévation de l'homocystéine; de plus, des mécanismes moléculaires et cellulaires affectés par une hyperhomocystéinémie tels que l'inflammation, la méthylation de l'ADN, les voies de signalisation (de l'oxyde nitrique (NO), du TGF- β « Transforming Growth Factor β » et des récepteurs couplés aux protéines G « RCPG ») (90). En effet, l'hyperhomocystéinémie participe à l'élévation du stress oxydatif, ce qui pourrait affecter la respiration mitochondriale et donc interférer avec la production d'ATP. Les dommages musculaires seraient l'une des conséquences (90).

3. Hypohomocystéinémie : un facteur de risque indépendant associé à la sévérité de l'EM ?

L'hypohomocystéinémie correspond à une faible concentration de l'homocystéine plasmatique, dont la valeur est inférieure à 6 $\mu\text{mol/L}$ (98).

3.1 Contexte d'exploration d'une hypohomocystéinémie

Une revue de la littérature scientifique sur Pubmed a révélé seulement 8 publications associées à l'hypohomocystéinémie. L'association des niveaux élevés en homocystéine avec des pathologies graves, notamment les maladies cardiovasculaires, est bien documentée dans la littérature. Cependant, l'hypohomocystéinémie peut s'avérer être également un facteur de risque indépendant de différentes pathologies (98).

En se focalisant sur le cycle de la méthionine (la trans-sulfuration), l'homocystéine est un intermédiaire clé de cette voie. D'un point de vue quantitatif, des faibles niveaux en homocystéine vont altérer la production de la cystéine mais aussi le glutathion, la taurine et le sulfate, ce qui augmenterait le stress oxydatif. En outre, la diminution du glutathion (1) accélère la formation de radicaux libres, (2) diminue la capacité de défense contre les infections et (3) la détoxification des substances cancérogènes (90, 91, 98).

3.2 Facteurs déterminants d'une baisse de l'homocystéine circulante

Plusieurs facteurs peuvent être mis en cause en cas de baisse de l'homocystéine :

- Carence nutritionnelle
 - Une faible consommation des aliments riches en méthionine et cystéine
 - Une carence vitaminique (plus précisément folate et/ou vitamine B12)
- Production accrue du glutathion, protecteur endogène le plus important (91)
Synthèse accrue et « prolongée » des autres molécules d'intérêt biologique (cystéine, taurine, sulfate) peut appauvrir les niveaux d'homocystéine
- Déficiency enzymatique (MTHFR)
- Réponses à certains médicaments

Afin de restaurer un niveau normal en homocystéine, les traitements les plus communément utilisés sont : la méthionine, la taurine et la N-acétylcystéine (116, 117).

Cullen CE et ses collaborateurs ont étudié la relation entre l'hypohomocystéinémie et la neuropathie périphérique idiopathique (NPI) (118). Chez une première patiente souffrant de NPI, ils ont observé que cette dernière présentait un faible niveau d'Hcy, de l'ordre de 3.6 $\mu\text{mol/L}$. En outre, au niveau génétique, le gène MTHFR avait la mutation mono-nucléotide sur un allèle, A1298C (118). L'administration orale de la méthionine a, dans un premier temps, restauré un niveau normal de l'homocystéine plasmatique (7.9 $\mu\text{mol/L}$), et sur le plan clinique, une nette amélioration de son état de santé a été observée (118). Cette exploration initiale suggère qu'une hypohomocystéinémie peut avoir des conséquences négatives. En second lieu, un dosage de l'homocystéine plasmatique totale chez 210 patients souffrants de neuropathie périphérique idiopathique a été réalisé, parmi lesquels 41% avait une hypohomocystéinémie (118).

C. Considération du rôle épigénétique des microARNs dans la régulation du métabolisme de la méthionine – homocystéine

1. Généralité sur les microARNs

La découverte des microARNs (miARNs) découle du séquençage du génome humain en 2000 (119). En 2008, ils ont été détectés dans la circulation sanguine (84). *Lin-4* et *Let-7*, les deux premiers miARNs identifiés dans l'organisme *C. elegans*, sont impliqués dans le contrôle du processus larvaire (120-122). Ils ont été retrouvés également dans différents organismes. Depuis leur découverte, la communauté scientifique porte un intérêt majeur sur ce domaine de recherche; en effet le nombre de publications suit une courbe exponentielle, avec 5 articles en 2001 puis 8 767 en 2016. Les miARNs, régulateurs épigénétiques endogènes et évolutivement conservés, sont impliqués dans un certain nombre de mécanismes biologiques sophistiqués comme la prolifération, la différenciation et la sénescence cellulaire, ainsi que d'autres processus biologiques encore mal caractérisés (122). Les miARNs sont des petits ARNs non-codants (ne portant pas d'information pour une protéine), simple-brin d'environ 22 nucléotides (allant de 18 à 25 nucléotides de longueur) (123). Ils contrôlent l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle: par interférence (destruction de l'ARNm), par inhibition de la traduction (blocage du

ribosome) en se fixant aux régions 3' non traduites (3'UTR) (83, 124, 125) ou encore, c'est une autre possibilité, en ciblant la partie 5'UTR et activer l'expression de certains gènes (84, 126).

Les miARNs peuvent être régulés de manière différentielle selon leur contribution au processus physiologique normal et dérégulés dans le cadre de processus pathologiques (127, 128). Prenons l'exemple du miR-224 impliqué dans le carcinome hépatocellulaire. Ce carcinome est la principale cause de décès chez les patients cirrhotiques et représente également la deuxième cause de décès par cancer dans le monde. Le miR-224, a été identifié comme étant un biomarqueur sérique et est donc utile pour le diagnostic mais aussi pour contrôler et évaluer la dynamique pré- et post-traitement (127).

Dans le contexte d'expression différentielle chez les patients *vs* les sujets sains, plusieurs études ont cherché à caractériser l'expression des miARNs à travers différentes pathologies (infectieuses, cardiovasculaires, neurologiques, cancéreuses, musculo-squelettiques...). À ce jour, plus de 35828 miARNs matures ont été identifiés dans 223 espèces différentes à partir de 28645 entrées correspondant aux précurseurs de miARNs, dans la dernière version de miRBase (version 21, <http://www.mirbase.org/>) (129). Chez l'homme, plus de 2500 miARNs matures sont y répertoriés. En effet, il a été indiqué que plus de 60% des gènes peuvent être régulés par ses petits ARNs non codants. Dans des contextes pathologiques, plusieurs études ont identifié des dérégulations au niveau de l'expression de certains miARNs. Un seul de ces petits ARN peut cibler plus de 200 ARNm différents et un seul ARNm peut être ciblé par de multiples miARNs (128, 130). Ils peuvent donc réguler de nombreuses voies biologiques. Cela montre le degré de régulation de l'expression des gènes par les miARNs.

1.1 Mécanisme de biogenèse de cette classe d'ARN non-codant

La biogenèse des miARNs est un processus cellulaire qui se déroule en plusieurs étapes délimitées dans les compartiments cellulaires que sont le noyau et le cytoplasme. La figure 6 illustre ce mécanisme. Les miARNs peuvent provenir : d'exons, d'introns de transcrits codants ou non, mais aussi de gènes de miARNs ou de transcrits polycistroniques (83, 120). Les miARNs, excisés par le complexe d'épissage, de manière indépendante du complexe

microprocesseur, sont appelés mirtrons (autre mode de biogenèse de miARNs, provenant d'introns et formant directement des pré-miARNs en échappant au clivage de Drosha). L'ARN polymérase II, dans la majorité des cas, transcrit la région et le produit de cette transcription est le pri-miARN pour (précurseur primaire) (122). Il s'agit de longs précurseurs doubles brins polyadénylés ayant une coiffe en 5' et une forme tige-boucle ; dont la structure est propice au clivage par des nucléases. Ce pri-miARN possède une taille variable (de plusieurs milliers à plusieurs centaines de nucléotides). Par la suite, ce dernier sera clivé par un complexe microprocesseur composé de Drosha, (une endonucléase nucléaire qui effectue des coupures au niveau des ARN double brins) et DGCR8 (di George syndrome critical region gene 8), son cofacteur qui a la faculté de reconnaître les boucles de mésappariement du pri-miARN et de recruter Drosha sur la structure afin qu'elle effectue son clivage au niveau de la base de la structure en tige/boucle (clivage asymétrique de la tige avec deux nucléotides non appariés en 3'-OH du produit). Suite à cette première étape de maturation, on obtient donc le pré-miARN (de 60 à 70 nucléotides de long, formé d'une seule structure tige/boucle imparfaite). Tout cela se déroule dans le noyau (84, 122, 128). Son exportation vers le cytoplasme se fait grâce à l'Exportine-5, par un transport actif GTP-dépendant (cofacteur Ran-GTP, à travers le nucléopore) (123). L'exportine-5 se lie seulement aux pré-miARN correctement clivés. Une fois dans le cytoplasme, un complexe formé de Dicer, une endonucléase de la famille des RNases III, et TRBP2 (RISC-loading complex subunit), reconnaîtra et coupera la structure tige/boucle : un duplex miARN/miARN est alors formé (entre 18 et 24 nucléotides) avec des régions qui ne sont pas totalement appariées (122). Après un processus de sélection du brin effecteur, un des deux brins est dégradé alors que le deuxième est préférentiellement choisi et maintenu dans le complexe: il s'agit du miARN mature. Celui-ci va être incorporé dans un complexe multiprotéique RISC (RNA-induced silencing complex) comprenant une endonucléase de la famille des Argonautes, Ago2, qui va stabiliser l'interaction entre le miARN et son ARN messenger cible (122). Ce dernier complexe contient donc le miARN, RISC, Ago2, mais aussi une protéine GW182 de 182kDa (glycine-tryptophanprotein). Il existe quatre types de protéines Ago ; Ago2 identifiée dans ce complexe, est impliquée dans le clivage endonucléique de l'ARNm et sa dégradation chez les mammifères (123, 125).

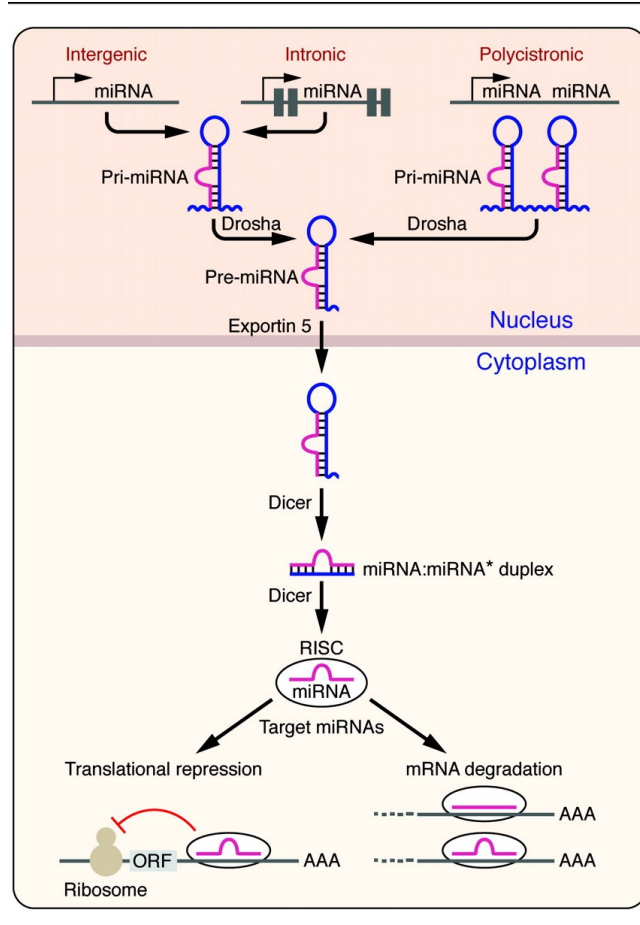


Figure 6 : Organisation génomique, Biogenèse canonique et Mode d'action principal des miARNs

La production des miARNs matures s'effectue au sein de deux compartiments cellulaires (le noyau et le cytoplasme). La transcription par l'ARN polymérase II des séquences codant pour des miARNs génère un pri-miARN (long transcrit appelé microARN primaire) caractérisé par la présence de structures secondaires en forme de « tige boucle ». Ce dernier est clivé par le complexe Microprocesseur (constitué principalement des protéines Drosha et DGCR8), grâce à l'activité RNase III de Drosha. Cela correspond à l'étape de maturation nucléaire. On obtient donc le pré-miARN qui est exporté vers le cytoplasme par transport actif. Il est pris en charge par le complexe RLC (Risc Loading Complex) qui clive la boucle apicale du pré-miARN grâce à l'activité RNase III de Dicer. Le brin d'ARN qui correspond au miARN mature est chargé sur la protéine Argonaute pour former la particule RISC. La

séquence du miARN mature guide le complexe RISC jusqu'à l'ARNm cible pour induire sa dégradation ou réguler sa traduction en protéine. Figure adaptée d'Eva van Rooij (119).

1.2 Mode d'action des miARNs

L'interaction des miARNs se fait en général dans les 3'UTR des ARNm (84). La fixation du miARN à sa cible doit être parfaite dans sa région 5'. Le miARN mature contient donc une séquence spécifique dites « seed » : elle correspond aux nucléotides 2 à 8 (voire 2-7) de sa région 5'UTR (untranslated region) correspondant à sa région 5' d'ancrage (126). Le miARN mature, toujours associé au complexe RISC, va alors se fixer sur l'ARNm cible : la séquence seed va interagir par appariement en se liant à la région 3'UTR des ARNm. Si la complémentarité est parfaite avec sa cible, on aura une coupure de l'ARNm suivie de la dégradation du duplex miARN-ARNm. Cela peut se produire sur certains ARNm car suite à la liaison on aura un recrutement de complexes de déadénylation qui vont raccourcir la queue polyA. De ce fait, il y aura une excision de la coiffe sur l'ARNm par des complexes de décoiffage suivie d'une dégradation par Xrn1, une exonucléase (131).

Si dans le cas contraire, elle s'avère être imparfaite (partielle), il y aura une inhibition de la traduction; la plupart du temps chez l'Homme, ce sont des appariements imparfaits qui surviennent. Kiriakidou M, et *al.*, ont suggéré que le blocage de l'initiation de la traduction des ARNm se fait par compétition d'interaction des protéines entre les protéines Ago et eIF4E pour la liaison à la coiffe (132). Tandis que Chendrimada TP, et ses collaborateurs proposent que cela puisse se produire, lorsque le miARN y est fixé, il empêche la formation du ribosome, c'est-à-dire que le recrutement de la sous-unité ribosomique 60S à l'autre sous-unité (40S) est inhibé (133). ChendrimadaTP, et *al.*, considèrent qu'il y a une inhibition de la post-initiation de la traduction des ARNm car le complexe contenant le miARN peut entraîner une dégradation du polypeptide naissant car la fixation de ce complexe recrute une protéase non caractérisée et donc cela réduit ainsi la quantité des protéines (133).

1.3 Accumulation des microARNs dans les fluides biologiques

Les microARNs peuvent être détectés dans de nombreux fluides biologiques tels que l'urine, le sang, le liquide céphalo-rachidien, la salive, le liquide séminal, le lait maternel, etc. (84, 134). La première étude a montré que des miARNs circulants dans le plasma de patients ont une stabilité remarquable et une résistance à la dégradation par les RNAses endogènes (135). Des études précédentes ont identifié des miARNs dans les 12 fluides biologiques existants dans des proportions différentes (84). Néanmoins, leurs cellules progénitrices restent difficiles à caractériser car ils peuvent provenir de différents tissus. En revanche, la dégradation dans le plasma des miARNs synthétiques a été observée en quelques minutes. Ainsi, les miARNs nus sont sensibles aux RNAses avec une dégradation rapide dans le plasma, tandis que les miARNs présents dans le sang sont protégés par des mécanismes résistants à l'activité des RNAses. Ces miARNs dits circulants, sont donc très stables parce qu'ils sont dans des exosomes et/ou associés à des complexes lipido-protéiques. Au début, leur présence dans les fluides biologiques n'était pas considérée comme importante car il était proposé à l'époque que ceux-ci découlaient simplement de la mort cellulaire de cellules apportant ainsi un déversement du contenu cytoplasmique (mécanisme passif). Actuellement, il y a eu un reversement de situation car les cellules peuvent avoir une sécrétion (mécanisme actif), dans ce cas complexe, de ces miARNs (84). La Figure 10 illustre cette sécrétion et met en évidence l'association des miARNs à différentes structures ou encore à des composés lipidiques, leurs permettant de circuler dans les fluides biologiques, sous une protection appropriée. Dans ce cas, les miARNs agissent comme étant des facteurs paracrines, sécrétés par différents types cellulaires (84). Ils circulent en étant inclus à des composants cellulaires. Il a été proposé que les miARNs circulants puissent résider dans des microvésicules (exosomes, microparticules, corps apoptotiques), ou être intégrés au sein de complexes protéiques, de lipoprotéines (HDL (high-density lipoprotein) ou LDL (low density lipoprotein)) (84, 134, 136); ce qui expliquerait leur protection contre l'activité RNase et l'exfoliation des miARNs dans la circulation.

Part un processus d'invagination de la membrane plasmique qui induit la formation de corps multi-vésiculaires dans le compartiment cellulaire, l'endosome fusionnera avec la membrane plasmique. Les exosomes libérés dans le milieu extra-cellulaire contiendront divers types de molécules (ARNm, protéines, mais aussi des miARNs) (84). Néanmoins, la majorité des miARNs circulants sont véhiculés par des complexes protéiques et plus précisément ils sont complexés à la protéine Ago2 dans 90 à 95% des cas (84). La protéine Ago2 fait partie du complexe RISC. Turchinovich et ses collaborateurs, ont identifié le complexe Ago2/miARN dans des surnageants de culture cellulaire (137). Afin de vérifier cela, Arroyo *et al*, ont effectué une précipitation du plasma, et ont montré que ce complexe n'était associé pas aux microvésicules. Ce complexe étant stable, Ago2 protège le miARN contre les RNAses présents dans le sang (138). Cette découverte a, de ce fait, propulsé les chercheurs à identifier des miARNs comme étant des biomarqueurs sériques dans les cancers (127).

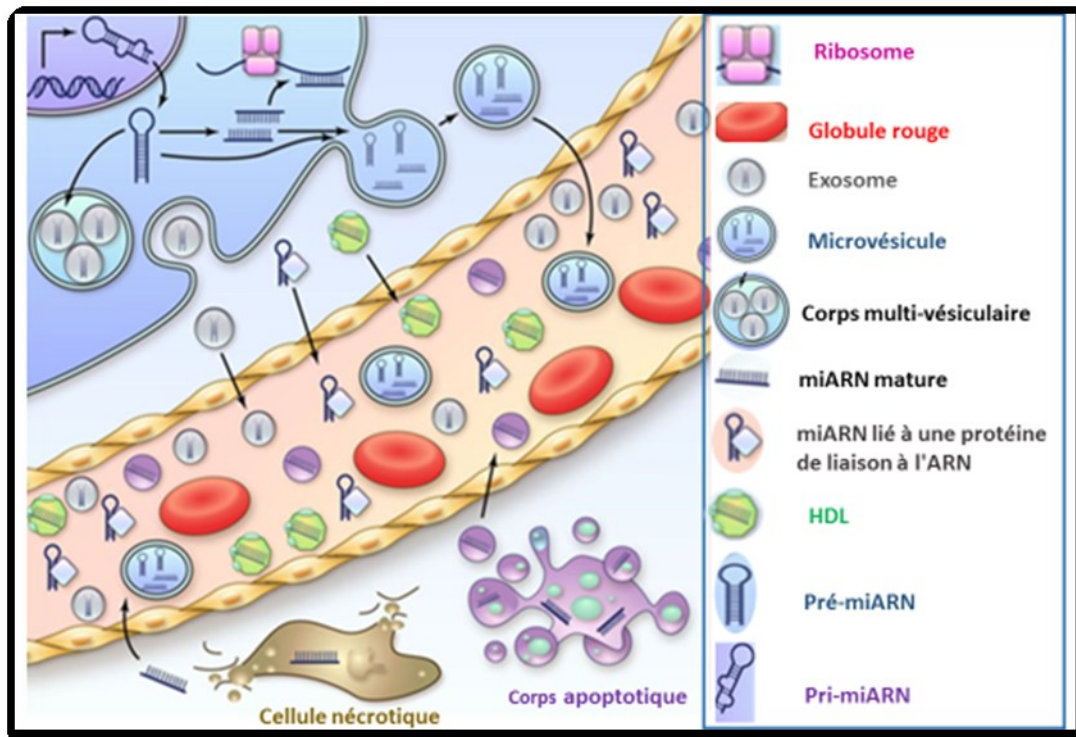


Figure 7 : miARNs circulants

Les miARNs circulants sont présents dans le milieu extracellulaire (MEC). Après leur production par une cellule mère, ils sont sécrétés dans le MEC sous quatre formes principales les protégeant de la dégradation par les RNases: - miARN complexé avec la protéine Argonaute (forme non lipidique et majoritaire), miARN sont associés à des structures lipidiques (exosomes, corps apoptotiques, microvésicules), -miARN associés aux lipoprotéines de type HDL (high-density lipoprotein) ou LDL (low density lipoprotein). Figure adaptée de Kumarswamy R, et *al.* (139).

1.4 miARNs circulants : Fonction et potentielle application en clinique

À ce jour, la modulation de l'activité des miARNs à des fins thérapeutiques est envisagée et différentes approches peuvent se concevoir. Par exemple, Golkar Z, et *al.*, suggèrent que des miARNs identifiés *in silico*, pourraient inhiber les souches du virus Ebola par leur mode d'action, ce qui induirait une dégradation des transcrits viraux et donc réduire l'épidémie (140).

Un ou plusieurs miARNs peuvent être identifiés par microarray. Dans une approche « antagoniste », l'utilisation d'anti-miARN (oligonucléotides synthétiques complémentaires : AMO (anti-miARN oligo-nucleotides), des LNA (locked nucleic acids) et des "antagomiRs") dirigé contre sa cible (un miARN humain choisi) permettra de modifier l'expression du miARN fonctionnel et de ce fait atténuer l'activité du miARN *in vivo* (141, 142). Ce miARN choisi et ciblé peut être surexprimé de façon pathologique dans un cancer et avoir une fonction oncogénique. Néanmoins, il y a une limite à injecter plusieurs anti-miRs dans le cas où plusieurs miARNs sont mis en jeu. C'est pourquoi, plusieurs équipes de chercheurs sont à concevoir des éponges à miARNs à partir d'ADN synthétiques, ayant des séquences complémentaires pour plusieurs miARNs afin de les séquestrer. En outre, l'injection de miR-mimic chez des patients pourra rétablir ou pallier l'expression d'un miARN ayant un effet bénéfique. Il s'agit donc d'une approche « agoniste » (141). Par ailleurs, Luo M, et *al.*, ont montré qu'une hyperglycémie entraîne une diminution de l'expression du miR-30c, exprimé dans les plaquettes, ce qui provoque une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 aussi appelé PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). Plusieurs études ont mis en évidence une association entre le diabète de type II (DM2) et la régulation à la hausse de PAI-1 (143). Cependant, le mécanisme sous-jacent est mal compris. En effet, le rôle de PAI-1 est d'inhiber principalement les activateurs du plasminogène dans le système fibrinolytique (143). Dans des conditions particulières, les concentrations plasmatiques de l'inhibiteur PAI-1 sont augmentées, ce qui altère la fonction fibrinolytique (143). Le miR-30c est un régulateur de l'expression de PAI-1 et ce mécanisme épigénétique suggère la formation de thrombus chez des patients présentant un DM2. Afin de pallier à cette dérégulation, ils ont injecté un lenti-miR-30c dans une souris diabétique (HFD-fed diabetic mice) pour augmenter l'expression de miR-30c ce qui induisait une diminution de PIA-1 (143). L'augmentation de l'expression du miR-30c pourrait donc diminuer le risque de thrombose chez les patients diabétiques (DM2).

Parmi d'autres approches thérapeutiques envisagées, Kusaoi M, et coll. ont montré qu'il était possible d'éliminer directement les miARNs dans le sang par plasmaphérèse en utilisant les dispositifs de filtration sur membrane (144). En effet, ils ont réalisé cette preuve de concept en montrant que cette approche pouvait réduire le taux des miARNs

circulants chez trois patients atteints de lupus (144). Pour effectuer la réduction, de façon sélective, des miARNs circulants il a été suggéré qu'il faut tenir compte du diamètre des pores de la membrane de séparation et/ou des différents ligands et des absorbants (144). De plus, Kusaoi M, et *al.*, ont souligné que l'efficacité de séparation des miARNs circulants varie en fonction des patients (144).

Les miARNs sont modulés par l'exercice (145, 146); les profils d'expression des miARNs régulateurs épigéniques, changent en réponse différents changements environnementaux (stimulation biomécanique suite à un effort physique, au froid, en réponse à la chaleur, à certaines radiofréquences (RF)...) (145-151). Dasdag S, et *al.*, ont montré, après avoir exposé des rats aux champs de radiofréquences (trois heures par jour, pendant 12 mois), l'expression du rno-miR-107 avait diminué (152). Une exposition à long terme aux RF (900MHz) peut moduler l'expression de certains miARNs (152).

2. microARNs impliqués dans la régulation des niveaux d'homocystéine

Les concentrations en homocystéine dépendent des taux de vitamines (les cofacteurs B6, B12 et folate) et de la régulation de plusieurs gènes. En dehors de la régulation génétique des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine, des récepteurs ou transporteurs des vitamines, il existe des mécanismes épigénétiques médiés par des microARNs qui régulent l'expression de ses derniers (114).

2.1 Implication des microARNs dans la régulation de l'homocystéine

Par leur mode de fonctionnement, les microARNs régulent l'expression de nombreux gènes. En fonction du mode d'appariement d'un microARN, ce dernier diminue l'expression de ses cibles dans la majorité des cas. L'expression des miARNs peut être influencée par de nombreux facteurs, par exemple la quantité de folate.

Marsit CJ, et *al.*, ont observé que 24 miARNs cellulaires présentaient une expression différentielle lorsque des cellules lymphoblastoïdes humaines ont été cultivées en absence de folate, notamment le miR-222 (153). Dans le métabolisme de l'homocystéine, le cycle folate participe à la synthèse et à l'échange de groupements méthyles (Figure 4).

Un mauvais fonctionnement au sein du métabolisme de la méthionine – Hcy, peut être associé à des valeurs aberrantes en homocystéine. En effet, Stone N, et ses collaborateurs ont étudié l'implication des microARNs dans la régulation de cette voie métabolique à l'aide de méthodes de prédiction de cible. Ils ont identifié plusieurs miARNs potentiels (miR-22, miR-125, les paires miR-344-5p / 484 et miR-488). Les six gènes suivants (MTHFR, TCblR, TCN2, SLC19A1, MAT2A et MTHFD2) semblent avoir au moins un site de fixation pour le miR-22, ce qui suggère qu'une régulation à la hausse de ce miARN pourrait avoir un effet direct sur les processus impliquant ces gènes ciblés. De plus, certains miARNs agissent en coopération avec d'autres miARNs afin de réguler l'expression d'un ARNm. Cependant, la présence d'un SNP dans un gène donné peut influencer la fixation d'un miARN sur sa cible (154).

Leur implication a été indiquée dans la régulation de certaines enzymes clés de la voie métabolique de l'homocystéine, notamment MTHFR qui joue un rôle central dans le cycle du folate. Il a été suggéré que les miR-22-3p et miR-149-5p affectent l'expression du gène MTHFR (en ciblant la région 3'UTR) par conséquent, leur surexpression peuvent induire une hyperhomocystéinémie (155).

Une récente étude a démontré une corrélation entre deux miARNs plasmatiques (miR-143 et miR-145) et l'hyperhomocystéinémie chez des patients atteints d'athérosclérose (156). En dehors des variants génétiques qui peuvent réguler l'activité enzymatique de la méthionine synthase (MTR), des miARNs peuvent avoir un effet fonctionnel sur l'expression de MTR. L'enzyme MTR contribue à l'élimination de l'homocystéine, lors d'un transfert d'un groupement méthyle afin de former la méthionine (Figure 4). Toutefois, chez les adultes, en cas de défaillance de MTR, l'activité de cette enzyme sera compensée par BHMT ou CBS afin d'éliminer l'Hcy (157). En effet, Zhao JY, et *al.*, ont identifié trois miARNs (miR-485, miR-608 et miR-1293) qui diminuent significativement l'expression

de MTR lorsque ce gène présente le polymorphisme rs1131450 (+ 905G> A) dans sa région non-codante, ce qui induit une élévation de l'homocystéine (157). En effet, ils ont démontré expérimentalement que la présence de ce SNP contribue à la fixation des trois miARNs (157).

Afin d'étudier l'implication des miARNs dans l'altération de la barrière hémato-encéphalique, les travaux de Kalani A, et *al.*, ont démontré que l'expression du miR-29b est régulée à la hausse en présence d'une augmentation des niveaux d'Hcy. De plus ce miARN cible le DNMT3b, ce qui suggère que son expression est inversement corrélée à la méthylation de l'ADN (158).

Les points ci-dessus concluent que des mécanismes épigénétiques, plus spécifiquement des microARNs sont impliqués dans l'augmentation de l'homocystéine dans certaines pathologies. Cependant, aucune recherche n'a étudié l'implication des miARNs dans la diminution et/ou le maintien des faibles concentrations en homocystéine.

2.2 microARNs : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques de l'homocystéine ?

Les marqueurs biochimiques sont des molécules dont la concentration dans un fluide biologique varie en fonction de l'évolution d'une maladie ou en réponse à certains traitements pharmacologiques. Dans le milieu clinique, on se tourne vers de nouveaux biomarqueurs moins invasifs car dans certaines pathologies, peu de molécules ont passé le cap de la validation pour se définir comme étant un outil biologique de détection, diagnostique, pronostique et/ou thérapeutique en raison de leur manque de spécificité et de sensibilité (127).

La présence et la stabilité des miARNs dans les fluides biologiques, mais aussi leur rôle de facteur paracrine sont les critères premiers recherchés pour être un biomarqueur (84, 159). L'identification de miARNs spécifiquement associés à l'homocystéine, et plus précisément une signature de miARNs dérégulés dans une condition d'hyper ou encore

d'hypohomocystéinémie pourrait s'avérer très intéressant. En effet, l'expression des miARNs peut être affectée par une diète, une carence et éventuellement l'apport de nutriment, par exemple les vitamines (160). Une revue intéressante présente différents composés pouvant moduler l'expression de ses régulateurs moléculaires, mais également les miARNs peuvent être utilisés comme agents thérapeutiques (160). Nous pouvons suggérer que l'utilisation de petites molécules faisant varier les concentrations en homocystéine, peut modifier le profil d'expression de certains miARNs candidats. Cette relation peut s'avérer bénéfique si le traitement suggéré provoque une amélioration de l'état de santé des patients atteints d'encéphalomyélite myalgique.

3. microARNs potentiellement impliqués dans la pathogenèse de l'EM

3.1 miARNs impliqués dans la manifestation des symptômes de l'encéphalomyélite myalgique

Suite à un effort physique (épreuve effectuée sur un vélo), Baraniuk JN, et ses collaborateurs ont identifié des miARNs provenant du liquide-céphalo-rachidien (LCR) qui présentaient une expression différentielle chez des malades touchés par l'encéphalomyélite myalgique (161). Ses ARNs non codants sont mentionnés dans le Tableau 9. L'épuisement physique et cognitif caractérisant le malaise après l'effort des patients EM, se manifeste d'avantage après un simple effort, ce qui suggère que des miARNs peuvent intervenir dans le maintien de cet état de fatigue (161).

Prenons l'exemple des travaux de Veeranki S, et al, portés sur un modèle murin (souris CBS +/-). Ce modèle animal présente une hyperhomocystéinémie qui a été associée à une faiblesse et une fatigue musculaire, dues à une diminution de la production d'ATP, comme mentionné plus haut. Dans une telle condition, des changements moléculaires ont été révélés, notamment au niveau épigénétique, une élévation significative de deux miARNs (miR-31 et miR-494) et une diminution de deux molécules cibles de ces derniers. Le miR-31 interagit avec la dystrophine, une protéine présente dans tous les muscles qui est impliquée dans le maintien de leur architecture. Le miR-494 cible mTFA, le facteur de

transcription mitochondrial A, qui est l'un des activateurs clés de la transcription des mitochondries (90). Des niveaux élevés en homocystéine influencent le profil d'expression de certains miARNs, de même que des miARNs peuvent être impliqués dans la manifestation des différents symptômes de l'EM. Cependant les mécanismes épigénétiques sous-jacents ne sont pas tous encore examinés.

3.2 miARNs : biomarqueurs et/ou cibles thérapeutiques dans l'EM

Avec l'explosion de la recherche de ces dernières années sur les miARNs, de nombreux cribles ont mis en évidence des variations au niveau des profils d'expression des miARNs et de certains gènes leur étant associés. Ces cribles ont mis en évidence l'implication potentielle de certains miARNs dans des maladies complexes (162-164). Ces régulateurs de l'expression génique semblent être des candidats potentiels dans cette quête difficile de biomarqueurs efficaces et spécifiques. Les miARNs ne sont pas seulement des biomarqueurs. Ils sont aussi considérés comme des cibles thérapeutiques. En effet, plusieurs études ont démontré que le niveau d'expression de certains miARNs pouvait être modulé par certains traitements et même des molécules aussi simples que la vitamine D ou le glucose comme mentionné ci-dessus (165). Ainsi, l'expression de miR-375 influencerait la réponse à la docetaxel dans le cancer *de la prostate métastatique résistant à la castration (CPmRC)* (166). Une élévation de l'expression de miR-375 était corrélée à la survie des patients (166). Les microARNs peuvent, de ce fait, prédire la réponse à certaines thérapies. Le glucose ou la vitamine D peuvent moduler positivement ou négativement l'expression de certains miARNs (160). Zitman, et coll. ont montré que, dans des conditions diabétiques (hyperglycémie), les miR-510 et miR-659 étaient surexprimés et après un traitement par le calcitriol, le niveau d'expression de ces miARNs diminuait. Tandis que les miR-126, miR-411, miR-20b, miR-15a et miR-181c étaient régulés à la baisse dans des conditions diabétiques mais surexprimés après le traitement (167).

En ce qui concerne l'encéphalomyélite myalgique, différents travaux ont analysé l'association de la pathologie avec les miARNs, facteurs à différents stimuli. Le tableau ci-

dessous présente des miARNs, cellulaires, plasmatiques ou provenant du LCR, identifiés par différentes équipes de recherche.

Tableau 8. Liste des microARNs candidats identifiés dans différentes études étant associés à l'EM

Équipes de recherche	Fluides biologiques ou type cellulaire utilisés	microARNs validés par q-RT-PCR	Expression des miARNs	Références
Brenu EW, et al (2012)	Lymphocytes cytotoxiques cellules T NK et CD8 (+)	miR-21 (dans les 2 types cellulaires)	Augmentation	(85)
		miR-17-5p, miR-10a, miR-103, miR-152, miR-146a, miR-106, de miR-223, miR-191(dans NK)	Diminution	
Brenu EW, et al (2014)	Plasma	miR-127-3p, miR-142-5p, miR-143-3p	Augmentation	(86)
Petty RD, et al (2016)	Cellules <i>Natural Killer</i> (NK)	miR-99b, miR-330, miR-126, miR-30c	Augmentation	(3)
Baraniuk JN, et al (2017)	Liquide céphalo-rachidien	miR-328, miR-608, miR-let-7i-5p, miR-200a-5p, miR-93-3p, miR-126-5p, miR-186-3p, miR-19b-3p, miR-92a-3p, miR-505-3p, miR-323b-5p, miR-532-5p	Diminution	(161)

Le profil d'expression des miARNs cellulaires, plasmatiques et du LCR a été établi par différentes technologies (séquençage ou microarray) (3, 85, 86, 161). Toutefois, il peut y avoir de grandes variations entre l'expression d'un miARN identifié dans un type cellulaire par rapport au plasma ou encore, ce dernier peut être présent dans un milieu et pas dans l'autre. Cela peut s'expliquer par : (i) le mode d'excrétion des miARNs, ou éventuellement (ii) leur stabilité dans le milieu extracellulaire. Étant donnée la petite taille des miARNs, la validation par q-RT-PCR peut s'avérer difficile car : certains miARNs qui présentent une expression différentielle significative peuvent être identifiés tandis que les autres non, la spécificité du kit utilisé ou encore les contrôles endogènes, la reproductibilité de la manipulation peuvent être mis en cause.

D. Hypothèse et Objectifs

L'encéphalomyélite myalgique est une maladie complexe et son étiologie est inconnue. Suite à la recherche de biomarqueurs pour cette pathologie, nous avons identifié des concentrations plasmatiques anormales en homocystéine (hyperhomocystéinémie vs hypohomocystéinémie) chez des patients souffrants d'EM.

Mon projet de maîtrise visait à comprendre l'influence des niveaux plasmatiques en Hcy sur l'EM et à élucider les mécanismes moléculaires, biochimiques, génétiques et épigénétiques pouvant contribuer à une élévation et une diminution des niveaux d'homocystéine plasmatique chez deux sous-groupes de patients atteints d'encéphalomyélite myalgique.

Nous émettons les hypothèses suivantes :

L'élévation et aussi la diminution de l'homocystéine contribue à la pathogenèse de la maladie chez des sous-populations de patients EM notamment en exacerbant certains symptômes cardinaux dont le malaise après-effort.

Des variants génétiques, régulant l'activité des enzymes de la voie métabolique de l'homocystéine – méthionine, pourraient être en jeu, de même que certains micro-ARNs pourraient contribuer à interférer avec cette voie.

L'objectif principal de cette étude est de comprendre les causes de cette hyperhomocystéinémie modérée et de l'hypohomocystéinémie chez ces deux sous-groupes de patients EM. Dans ce contexte, la contribution de cofacteurs (vitamines B6, B12, C et folate) et de certains variants présents dans les gènes de la voie métabolique de l'homocystéine a été investiguée.

Chapitre 2. Article

Genetic and nutriepigenetic regulation of plasma homocysteine levels in myalgic encephalomyelitis

Contribution des auteurs

Chalder Lynda a réalisé la grande majorité des expériences, leur analyses et contribué à la rédaction du manuscrit.

Franco Anita a réalisé les analyses biochimiques, certaines analyses statistiques et contribué à la rédaction du manuscrit.

Godbout Christian a participé au développement du concept expérimental, et analysé les résultats et revu le manuscrit.

Nepotchatykh Evguenia a participé à l'analyse des microARNs, contribué à certaines analyses statistiques et au manuscrit.

Jean-Louis Martineau a réalisé toutes les analyses bio-informatiques au niveau des SNPs et à la rédaction du manuscrit.

Tremblay Valérie a assuré la coordination clinique du projet, le recrutement des participants et l'analyse des questionnaires.

Moreau Alain, chercheur principal de l'étude et responsable de son financement, a contribué au concept expérimental, à l'analyse de l'ensemble des résultats et à la rédaction du manuscrit

Genetic and nutriepigenetic regulation of plasma homocysteine levels in myalgic encephalomyelitis

Chalder L.^{1,2}, Franco A.¹, Godbout C.⁴, Nepotchatykh E.^{1,2}, Jean-Louis M.³, Tremblay V.³, Moreau A.^{1,2,5*}

(In preparation)

¹ Viscogliosi Laboratory in Molecular Genetics of Musculoskeletal Diseases, Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Quebec, Canada.

² Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada.

³ Sainte-Justine University Hospital Research Center, Montréal, Quebec, Canada

⁴ Sibylla-Hesse Foundation, Montreal, Quebec, Canada.

⁵ Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3A 1J4, Canada

***Corresponding author:** Dr. Alain Moreau
Research Center of the Sainte-Justine University Hospital
3175 Côte Ste-Catherine room 2.17.027
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Tel.: (514) 345.4931 ext. 5722
Fax: (514) 345.4801
E-mail: alain.moreau@recherche-ste-justine.qc.ca

Abstract

Elevated homocysteine (Hcy) levels have been previously associated with reduced host immune response and increased fatigability in different pathologies. We investigated a French-Canadian cohort of 112 ME patients and 58 age- and sex-matched healthy subjects according to the Canadian consensus criteria to assess whether there is any relationship between plasma Hcy levels and clinical parameters of myalgic encephalomyelitis (ME) symptoms. Biochemical parameters included plasma and urine levels of vitamins B6, B12, C and folic acid (FA), as well as 110 genotyped single nucleotide polymorphism (SNPs) known to regulate key genes involved in the methionine-homocysteine pathway. Hyperhomocystinemia (HHcy) was at a higher frequency in ME patients (22.3%) than controls (15.5%), while hypohomocysteinemia (hypoHcy) was less frequent in ME patients (32.1%) than controls (50%). Collection of three measures of disability and impairment using the DSQ, MFI-20 and SF-36 questionnaires revealed differences in symptomology among ME patients in function of their plasma Hcy levels. Male ME patients with HHcy showed a decrease in motivation compared to male ME with hypoHcy ($p < 0.05$). Additionally, sleep disorder scores were significantly higher in ME patients with HHcy and hypoHcy when compared to ME patients with normal levels of Hcy ($p < 0.05$). Finally, the HHcy subgroup showed more severe scores for post-exertional malaise ($p < 0.05$). Of note, HHcy occurring in ME patients could not be explained by deficiencies in vitamin B6 and B12, which led us to investigate possible genetic predispositions. Only two SNPs showed a strong association with ME patients after Bonferroni correction. Interestingly, the variant rs7703033 (MTRR) showed a strong association to ME independently of plasma Hcy levels, while the variant rs1801198 (TCN2) was more specifically associated

with ME patients with hypoHcy. In ME patients with HHcy, four SNPs (rs2124459 (CBS), rs17367504 (MTHFR), rs4257763 (SLC23A1), and rs1195646 (SLC23A2)) presented a potential association, but these were not significant following the Bonferroni correction. These findings demonstrate that they are important differences in disease characteristics across individuals with ME in French-Canadian population involving changes in plasma Hcy levels due to specific genetic predispositions.

Keywords: myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome, homocysteine, Vitamin B6, Vitamin B12, Vitamin C, Folate, single nucleotide polymorphisms, French-Canadian

Introduction

Myalgic encephalomyelitis (ME), also known as chronic fatigue syndrome (CFS), is a complex chronic disease whose etiology remains poorly understood. It has a wide variety of symptoms and is characterized by unexplained long-term fatigue and post-exertional exhaustion, which further amplify the symptoms. ME is life altering and for its more severe forms, can be life threatening. Of note, females are more affected in number (female/male ratio 5:2) and in severity when compared to males (1-3). ME is very common in all populations and a preview of the 2015 Statistics Canada unpublished Canadian Community Health Survey (CCHS), indicates that ME may be far more prevalent in Canada than previously thought, and more widespread than many more well-known conditions. The survey indicated that approximately 560,000 Canadians report having the disease, which represents a 36.7 percent increase since previous 2014 results (4). This number also suggests that the disease may be more common than breast cancer, Parkinson's disease and multiple sclerosis combined. ME incidence is higher during adulthood especially between the ages of 30 to 40 years, but it also affects children and adolescents (1, 5, 6). ME often leads to severe disabilities and represents a costly condition for both patients and healthcare systems. Severely affected patients are bedridden or at the very least housebound. Symptoms vary from patient to patient and are persistent or relapsing. Prognosis for recovery is poor. There is growing recognition that ME/CFS is a serious illness rooted in fundamental metabolic dysfunctions that impair energy production, immune functions and physiological response to exertion (7-9). Given the heterogeneous nature of the symptomology of ME, it is now widely accepted that its pathophysiology results from a combination of predisposing genetic factors, infections and/or environmental exposures.

Over the last few years, homocysteine (Hcy) has triggered a great interest given its role in different biological processes. Indeed, Hcy is a sensitive marker of one-carbon metabolism and its elevation has been associated with global DNA hypomethylation, activation of immuno-inflammatory pathways, and mitochondrial dysfunctions, which are also perturbed in ME (10-15). In 1997, Regland *et al.* reported increased Hcy levels in cerebrospinal fluid (CSF) in a small cohort of eleven patients suffering of ME with fibromyalgia (FM), although the Hcy levels in blood were usually not increased (16). Concomitantly, a decrease in vitamin B12 levels was observed and changes in Hcy and B12 levels in CFS correlated significantly with scores of mental fatigue. However, the contribution of Hcy on ME pathophysiology and the underlying mechanisms involved in hyperhomocysteinemia (HHcy) or hypohomocysteinemia (hypoHcy) have not been explored. Here, we investigated the impacts of plasma Hcy levels on ME pathogenesis, which led us to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes associated with ME pathogenesis, and others more specifically associated with patient subtypes based on their plasma Hcy levels.

Results

Demographic, clinical characteristics and blood markers

Demographic and clinical characteristics of participants from ME and control groups enrolled in this study are described in Table 1. All participants are French-Canadians of European descent, known for its unique genetic architecture. While both groups were statistically homogeneous in demographics, all ME patients showed lower physical and mental scores (SF-36) and increased scores related to the multidimensional fatigue

inventory (MFI-20) and the DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) ($P \leq 0.05$, 2-tailed Student T-test with equal variance). Biochemical biomarkers were measured for each participant and are described in Table 2. Patients with ME were stratified in function of their plasma Hcy levels. No significant changes were observed between men and women affected by ME. Of note, in our cohort, ME patients were more frequently affected by HHcy (22.3%) compared to age- and sex-matched healthy controls (15.5%), while hypoHcy was less prevalent in ME subjects (32.1%) than controls (50%).

Relationship between plasma Hcy levels and ME symptom severity

Results obtained with the SF-36 questionnaire, showed an increase in the severity of symptoms of ME patients (men and women combined) with HHcy as evidenced by a significant decrease in their physical score compared to ME patients with normal plasma Hcy level ($p = 0.057$). Analysis of the results obtained with the MFI-20 questionnaire revealed a significant reduction in motivation of male ME patients with HHcy compared to ME males with hypoHcy ($p = 0.035$). The analysis of the DSQ questionnaire also showed a significant difference between the controls and ME patients. The post-exertional malaise score was statistically higher in ME subjects with HHcy (men and women combined) compared with patients with normal homocysteine levels ($p = 0.032$). Of note, the score attributed to sleep disorders was also statistically higher in: (i) male ME patients with HHcy compared to male ME with a normal Hcy level ($p = 0.04$), (ii) male ME patients with hypoHcy compared to male ME patients with normal plasma Hcy values ($p = 0.017$).

Contribution of nutritional cofactors known to influence plasma Hcy levels

We first examined the potential nutritional cofactors to understand the origin of HHcy and hypoHcy occurring in our cohort. Our data showed that HHcy in ME patients is unlikely due to a nutritional deficiency in vitamin B6, B12, C or folate in contrast to controls with elevated plasma Hcy levels. In all the ME patients studied, the mean plasma values of vitamin B6, B12, C and folate were in the normal range. However, we noticed that the mean plasma folate values in ME patients with HHcy and vitamin B12 in hypoHcy patients were slightly higher compared to the other subgroups, although no significant differences was demonstrated. Under physiological conditions, daily excretion of vitamins B6, B12 and folate, which are important modulators of Hcy plasma levels, is minimal in both feces and urine. The dosage of the vitamins in the first morning urine samples of the participants made it possible to evaluate the digestive absorption. At the urinary level, vitamin B6, B12, C and folate were consistently normal in value in ME patients, after normalisation with urinary creatinine levels. This contrasted with the healthy subjects with HHcy, who exhibited much lower urinary concentrations of folate and vitamin B12 compared to the other controls subgroups and ME patients. Such differences suggested a nutritional deficiency in the control group only. Based on this finding, we undertook a genetic analysis of our cohort to further define the causes of HHcy and hypoHcy occurring in ME patients.

Genetic variants, ME pathogenesis and plasma Hcy levels

Common variants in genes regulating one-carbon cycle and Hcy metabolism were genotyped to determine their contribution in ME pathogenesis and regulation of circulating Hcy levels. Polymorphism distributions for the ME patient group and for the control

population are presented in Supplementary Table 1. A total of 110 SNPs were analyzed in the same cohort, in which plasma Hcy measurements were performed. For the genotyping analysis, additional unaffected French-Canadian controls, comprising of 7,000 healthy adult individuals, were obtained from the CARTaGENE project, using the historical data provided by CARTaGENE (17, 18). Ethnicity based on self-report was verified by principal component analysis of genotype data.

First, by simply comparing cases (ME patients) versus controls (unaffected subjects), our results showed one SNP (rs7703033) in the MTRR gene highly associated with ME as a clinical trait, independently of plasma Hcy levels (unadjusted p value = 0.00012). This association remains statistically significant even after Bonferroni correction ($p=0.007$). For genetic variants with a strong association with hypoHcy in ME patients, two variants, rs7703033 (MTRR) and rs1801198 (TCN2), were identified (Table 3). Interestingly, only rs1801198 (TCN2) remained significantly associated with ME patients with hypoHcy after Bonferroni correction ($p=0.011$). Two additional SNPs rs803422 (MTHFLD1; unadjusted p value = 0.059) and rs651933 (FOLR2; unadjusted p value=0.081) showed a borderline significant association prior to Bonferroni correction (Table 3). Of note, a significant difference was observed in plasma folate levels between ME patients classified in hypoHcy subgroup harboring the normal genotype (CC) in rs651933 compared to those harboring the other two variant genotypes (CT and TT combined) ($p < 0.05$). Consistently, the TT genotype (28.6%) was overrepresented in ME patients with hypoHcy when compared to ME patients with HHcy (4.3%) or the control group (14.3%).

In ME patients with HHcy, our results showed associations between the following polymorphisms: rs2124459 (CBS), rs17367504 (MTHFR), rs4257763 (SLC23A1), and rs1195646 (SLC23A2) prior to Bonferroni correction (Table 4). Of note, genes SLC23A1 and SLC23A2, which encode for vitamin C transporters, SVCT1 (SLC23A1) and SVCT2 (SLC23A2) (sodium-dependent vitamin C 1/2). The TT genotype in rs4257763 (SLC23A1) was overrepresented in this ME subgroup (56.5%) compared to other ME subgroups (34% and 39%) and controls (28.3%), and correlated with higher plasma vitamin C levels when compared to the CT and CC genotypes. Notwithstanding the trends observed, these differences did not reach a statistical significance.

Discussion

Homocysteine (Hcy) is a derivative of cysteine, an amino acid biosynthesized in the metabolism of methionine. The normal level of Hcy in fasting plasma ranges from 5 to 15 $\mu\text{mol/L}$. Elevation of circulating Hcy levels in the blood may sometimes be a result of genetic predisposition or a side effect of certain medications (19), but may also be related to nutritional deficiencies of vitamin B6, B12 or folate (20). High Hcy levels have been previously reported in the cerebrospinal fluid of patients affected with ME and FM, but not in their plasma (16). High concentrations of plasma Hcy is often associated with an increased risk of depressive disorders, anxiety, and neurocognitive impairment, as well as inflammatory bowel disease or IBD (21-23). In fact, the occurrence of ME doubles in patients affected with IBD when compared to a healthy population (24). Consistently, combination of select categories of the DSQ, MFI-20, and SF-36 questionnaires as well as the biochemical stratification of ME patients according to their plasma Hcy levels, revealed differences in symptomology among ME patients. Together these observations strengthen

the clinical relevance to measure plasma Hcy levels in ME patients due to its influence on specific symptom severity.

The lack of obvious nutritional deficiencies in ME patients prompted us to investigate the contribution of genetics and epigenetics in the regulation of plasma Hcy levels (19, 25). First, the discovery of a strong association between the variant rs7703033 (MTRR) and the development of ME (independently of plasma Hcy levels) was surprising and of great interest. MTRR gene is located on chromosome 5p15.3 and encodes for the enzyme methionine synthase reductase, in reducing cob(II)alamin (vitamin B12r) to methylcobalamin (MeCbl), the cofactor required for the maintenance of methionine synthase in a functional state. Besides its postulated role in the regulation of plasma Hcy levels, little is known about the impact of this SNP on MTRR activity. The strong association with ME pathogenesis independently of plasma Hcy levels suggest that MTRR could play additional roles that deserves further investigations.

The strong association of rs1801198 (TCN2) specifically in ME patients with hypohomocysteinemia is quite surprising. Indeed, a recent meta-analysis showed that subjects with the rs1801198 GG genotype has significant lower concentrations of holotranscobalamin (vitamin B12) and higher Hcy concentrations (only in European descents) than subjects with the rs1801198 CC genotype (26). We observed that plasma vitamin B12 concentrations were Homocysteine (Hcy) is a derivative of cysteine, an amino acid biosynthesized in the metabolism of methionine. The normal level of Hcy in fasting plasma is ranging from 5 to 15 $\mu\text{mol/L}$. Elevation of circulating Hcy levels in the blood

may sometimes be a result of genetic predisposition or a side effect of certain medications also higher in ME patients with hypoHcy when compared to the other ME subgroups and the control group. It remains unclear why the opposite associations were detected in that ME subgroup. This could reflect the genetic complexity and clinical heterogeneity of ME and await additional replication studies for confirmation of its clinical relevance in the ME pathogenesis. Regarding the other variants associated more specifically with HHcy, the intronic SNP rs2124459 identified in the cystathionine- β -synthase (CBS) gene seems to be associated with the phenotype of HHcy in ME patients (unadjusted p value <0.05). Two studies have indicated that this genetic variant rs2124459 has an association with serum vitamin B12 and folate concentrations; however the underlying mechanisms are not clearly characterized (27, 28). In our study, rs2124459 had a significant p value prior to Bonferroni correction (p=0.04) suggesting a potential association with HHcy in ME patients. The second intronic SNP, rs17367504, is localized in the methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, but this region also has other genes (29). The irreversible reaction of 5,10-methylene tetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate is catalyzed by MTHFR. Fedorowski A, *et al.*, previously reported that the variant rs17367504 (MTHFR) was associated with orthostatic hypotension (30), which is clinically relevant in the context of ME pathogenesis given the high prevalence of postural orthostatic tachycardia in ME. In addition, the work of Thomsen LC, *et al.*, suggested that this genetic variant was significantly associated with pre-eclampsia, a disease affecting some women during pregnancy that is characterized by high blood pressure. The minor allele (G) of this SNP showed a protective effect against the development of the pathology (31). Of note, variant rs17367504 indicated a potentially significant association with the elevation of Hcy present

in the group of diseased subjects (p value not adjusted <0.05). Even if vitamin C does not intervene directly in the metabolic pathway of the Hcy, it influences through its role of classic antioxidant, on the effects induced by Hcy. The work of Machado *et al.* showed that chronic HHcy decreased glutamate uptake and the activities of Na⁺, K⁺-ATPase, catalase and superoxide dismutase in the hippocampus of rats. The concomitant administration of vitamin C has the effect of preventing this effect. This pathway should be further investigated in ME patients

Our study has some limitations. Firstly, we only evaluated common polymorphisms known to modulate one-carbon pathway and Hcy metabolism. Additional rare variants could contribute more specifically to the regulation of circulating Hcy levels in ME subjects. Secondly, ME is a complex disease exhibiting heterogeneous phenotypes that depend on multiple other genetic factors as well as interactions with multiple environmental factors. Thirdly, our sample size of ME individuals is relatively small despite the addition of well-characterized healthy controls from the CARTaGENE database.

In conclusion, our findings indicate that changes in plasma Hcy levels further exacerbate ME symptoms, and such disease characteristics seem to involve specific genetic predispositions. Among others, the MTRR rs7703033 variant might be a genetic marker associated with the ME pathogenesis, while TCN2 rs1801198 variant appears to be more specifically associated with ME patients with hypoHcy in the French-Canadian population.

Table 1. Clinical and demographic Characteristics of ME/CFS patients and healthy subjects

Characteristics	ME patients	Healthy subjects
Number of subjects (Female/Male)	112 (88/24)	58 (24/34)
Reported mean age at disease onset (years)	50.24 ± 10.12	48.29 ± 10.29
Height (cm)	167 ± 8.60	170 ± 8.06
Weight (kg)	69.49 ± 17.70	72.37 ± 14.23
BMI (kg/m²)	25.21 ± 5.18	24.93 ± 4.33
36-Item Short Form Health Survey (SF-36) Scores		
Physical score	32.5 ± 13.9*	86.5 ± 13.4
Mental score	42.9 ± 18.8*	86.8 ± 9.8
Multidimensional Fatigue Inventory-20 (MFI) Scores		
General Fatigue	18.2 ± 2.7*	7.1 ± 2.9
Physical Fatigue	17.7 ± 2.9*	6.9 ± 2.8
Reduced Activity	15.5 ± 3.5*	6.6 ± 2.6
Reduced Motivation	11.0 ± 3.7*	6.0 ± 2.6
Mental Fatigue	15.0 ± 3.6*	6.5 ± 3.0
DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) Scores		
Autonomic/Neuroendocrine/Immune	40.1 ± 15.9*	6.0 ± 4.9
Cognitive	61.3 ± 18.1*	8.3 ± 10.3
Post-exertional malaise	69.2 ± 16.8*	13.13 ± 8.4
Sleep	46.5 ± 16.3*	12.2 ± 9.8

All data is represented as mean ± standard deviation. Values for the different SF-36, MFI and DSQ categories are represented as scores. 2-Tailed Student T test comparing ME patients and healthy controls were performed and were considered significant p-value < 0.05 (*).

Table 2. Biochemical parameters in ME/CFS patients and controls

Metabolites/Variables	ME patients			Healthy subjects		
	With low HCY n=36	With normal HCY n=51	With high HCY n=25	With low HCY n = 29	With normal n=20	With high HCY n=9
Plasma levels tHCY (μmol/L)	4.24 ± 1.13	9.58 ± 2.50	24.02 ± 8.82	3.56 ± 1.16	9.31 ± 2.48	24.50 ± 8.21
Plasma levels Pyridoxine (vitamin B6) (ng/mL)	8.90 ± 4.87	9.32 ± 4.28	10.05 ± 4.69	12.73 ± 13.48	7.30 ± 3.08	10.71 ± 9.06
Cobalamin (vitamin B12) (ng/mL)	9.33 ± 8.12	7.05 ± 8.66	6.50 ± 6.98	8.82 ± 9.00	4.13 ± 3.82	4.90 ± 4.37
Folic acid (vitamin B9) (ng/mL)	69.81 ± 37.15	75.13 ± 28.53	82.19 ± 49.12	98.67 ± 105.26	60.45 ± 26.12	68.70 ± 51.16
Vitamin C(ng/mL)	14.52 ± 4.69	16.19 ± 7.64	14.09 ± 8.88	12.69 ± 5.85	14.62 ± 9.01	16.89 ± 11.15
Urinary levels Pyridoxine (vitamin B6) (ng/mL)	3.53 ± 2.50	3,48 ± 3.05	3,22 ± 1.71	2.89 ± 2.14	3.25 ± 1.84	2.29 ± 0.69
VitB6/creatinine ratio (mg/g)	9.39 ± 5.63	8,47 ± 6.11	8,34 ± 5.11	7.46 ± 6.40	7.13 ± 5.11	6.32 ± 2.94
Cobalamin (vitamin B12) (ng/mL)	1.57 ± 1.52	1,73 ± 3.04	1.30 ± 0.66	1,26 ± 0.77	1.67 ± 2.28	1.08 ± 0.33
VitB12/creatinine ratio (pmol/umol)	0.34 ± 0.28	0.35 ± 0.37	0.28 ± 0.17	0.27 ± 0.20	0.29 ± 0.39	0.25 ± 0.12
Folic acid (vitamin B9) (ng/mL)	284.57 ± 655.95	274.89 ± 284.38	248.34 ± 283.40	166.51 ± 114.82	578.15 ± 1877.82	151.88 ± 205.00
VitB9/creatinine ratio (nmol/mmol)	180.74 ± 425.51	180.88 ± 187.20	172.70 ± 195.61	104.34 ± 77.44	227.53 ± 640.88	59.84 ± 46.50
Vitamin C (ng/mL)	4.79 ± 2.89	4.57 ± 2.02	6.56 ± 5.29	6.03 ± 4.97	13.69 ± 26.11	4.44 ± 1.25
VitC/creatinine ratio (mg/g)	0.01 ± 0.01	0,01 ± 0.01	0,02 ± 0.01	0,01 ± 0,01	0.03 ± 0.05	0.01 ± 0.004
creatinine concentration (mg/dl)	41.62 ± 16.42	41.58 ± 14.08	44.15 ± 17.42	43.64 ± 13.00	51.22 ± 14.38	39.24 ± 8.64

All data is represented as mean ± standard deviation.

Table 3. Top 5 Low HCY test SNP association results and relation to vitamins

SNP	Gene	Gene Name	χ^2	Bonferroni Correction	Related Vitamin	Allele	Plasmatic Vitamin Level (ng/ml)
rs1801198	TCN2	Transcobalamin II	0.0002322	0.01138	Vitamin B12	CC	9 ± 7 (4-14)
						CG	10 ± 10 (2-32)
						GG	10 ± 9 (2-29)
rs7703033	MTRR	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase	0.005044	0.2976	-	-	-
rs803422	MTHFD1L	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1 like	0.0599	1	-	-	-
rs651933	FOLR2	Folate receptor 2	0.08114	1	Folic Acid	CC	97 ± 50 (57-195)
						CT	67 ± 33 (41-161) *
						TT	58 ± 16 (41-82) *
rs1801133	MTHFR	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	0.1305	1	-		-

All data is represented as mean ± standard deviation. 2-Tailed Student T test comparing allele subgroups were performed and were considered significant p-value < 0.05 (*).

Table 4. Top 5 High HCY test SNP association results and in relation to vitamins

SNP	Gene	Gene Name	χ^2	Bonferroni Correction	Related Vitamin	Allele	Plasmatic Vitamin Level (ng/ml)
rs2124459	CBS	Cystathionine-beta-synthase	0.004987	0.2942	Vitamin B6	CT	10 ± 4 (6-19)
						TT	10 ± 5 (4-20)
rs17367504	MTHFR	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	0.03621	1	-		-
rs4257763	SLC23A1	Solute Carrier Family 23 Member 1	0.03992	1	Vitamin C	CC	13
						CT	10 ± 4 (7-15)
						TT	17 ± 12 (5-46)
rs11950646	SLC23A2	Solute Carrier Family 23 Member 1	0.0392	1	Vitamin C	TT	16 ± 11 (5-46)
						CT	9 ± 10 (3-7)
						CC	13
rs4820889	TCN2	Transcobalamin II	0.06015	1	Vitamin B12	AG	5 ± 3 (4-8)
						GG	7 ± 8 (2-35)

All data is represented as mean ± standard deviation. 2-Tailed Student T test comparing allele subgroups were performed and were considered significant p-value < 0.05 (*).

Materials and Methods

Participant Recruitment

The present study included 168 individuals, including 110 ME/CFS patients and 58 controls. The Institutional Review Board of Sainte-Justine Hospital approved this study (protocole #4740). All methods were performed in accordance to relevant guidelines. ME/CFS patients were recruited in accordance to the international consensus criteria defined by *Institute of Medicine of the National Academies*. Healthy control subjects were individuals without family history or symptoms of myalgic encephalomyelitis.

Specimen Collection

Peripheral blood samples of ME/CFS patients and age-matched controls were collected in EDTA-treated tubes and centrifuged. Derived plasma samples were aliquoted and kept frozen at -80°C until thawed and analyzed, for biochemical testing. Whole blood was also aliquoted for genomic DNA extraction. Morning urine of each participant was collected, aliquoted and kept frozen until analyzed.

Study of Psychometric Parameters in ME/CFS Patients

To evaluate the level of fatigue and quality of life of the study population, we used three distinct validated questionnaires: The 36-Item Short Form Health Survey (SF-36) (30), the Multidimensional Fatigue Inventory (MFI-20) (31), and the DePaul Symptom Questionnaire (DSQ) (32, 33). General fatigue was evaluated according to several parameters and stratified differently depending on each questionnaire. The SF-36 allowed us to score the individuals on their physical and mental fatigue. The MFI-20 allowed us to attribute scores to each individual for their general fatigue, physical fatigue, mental fatigue, reduced level of activity and reduced level of motivation. Finally, the DSQ allowed us to confirm the demographic data of the subjects as well as to measure the frequency and severity of symptoms in ME/CFS patients. Each symptom of the DSQ was then scored, and designated to a global symptom grouping: autonomic/ neuroendocrine/ immune symptoms, cognitive symptoms, post-exertional malaise symptoms, and sleep symptoms (34).

Biomarker Measurement in Plasma and Urine

Homocysteine was measured in the plasma of each participant by ELISA method, using the kit from USCN Life Science (Wuhan, China) and following manufacturer's instructions. The levels of Vitamins B6, B12, and Folic Acid were also measured in both the plasma and morning urine of each participant, by ELISA method, using kits from Elabscience Biotechnology (Houston, TX, USA) and following manufacturer's instructions. For the urinary levels of the vitamins, values were normalized by measuring creatinine levels. Creatinine in urine samples were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Vitamins B6, B12, and folate concentrations were normalised using the ratio (vitamin /creatinine) (35).

SNP Genotyping

To explore the relationship of ME/CFS with the hyperhomocysteinemia phenotype, a list of SNPs in candidate genes was generated by a review of literature (Supplementary Table 1). Genomic DNA was extracted from collected whole blood, using PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. To genotype SNPs from genomic DNA samples, samples were sent to the Genome Quebec Innovation Center (Montreal, QC, Canada). The iPLEX Gold assay (Agena Bioscience, San Diego, CA, USA) was used, combined with MassARRAY System for robust detection based on the mass of the various probes.

Statistical analysis

All biochemical data were expressed as means \pm standard deviations (SD) and were compared by 2-tailed Student's *t*-test with equal variance. Statistical significance was considered to be *P-value* < 0.05.

Genotype association analysis were performed using Plink software to evaluate the association of 110 SNPs with hyperhomocysteinemia and hypohomocysteinemia in ME patients. This SNP association analysis is based on the standard statistic model analysis and on linear regression including covariates (sex, age, HCY level, levels of vitamins B6, B12 and C folate). Bonferroni correction was performed and considered for the SNP association to be significant and we adjusted p-value according the false positive results. A Bonferroni corrected p-value of 10^{-3} was considered statistically significant. We used the Hardy Weinberg test to verify the homogeneity of the marker frequency rate upon the studied population.

Acknowledgements

The authors wish to thank all the individuals who participated in this study. This work was supported by a research grant (to A.M.) from The Sibylla-Hesse Foundation.

References

1. Gallagher AM, Thomas JM, Hamilton WT, White PD. Incidence of fatigue symptoms and diagnoses presenting in UK primary care from 1990 to 2001. *J R Soc Med.* 2004;97(12):571-5.
2. Jason LA, Richman JA, Rademaker AW, Jordan KM, Plioplys AV, Taylor RR, et al. A community-based study of chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med.* 1999;159(18):2129-37.
3. Bierl C, Nisenbaum R, Hoaglin DC, Randall B, Jones AB, Unger ER, et al. Regional distribution of fatiguing illnesses in the United States: a pilot study. *Popul Health Metr.* 2004;2(1):1.
4. Park J, Gilmour H. Medically unexplained physical symptoms (MUPS) among adults in Canada: Comorbidity, health care use and employment. *Health Rep.* 2017;28(3):3-8.
5. Afari N, Buchwald D. Chronic fatigue syndrome: a review. *Am J Psychiatry.* 2003;160(2):221-36.
6. Jordan KM, Landis DA, Downey MC, Osterman SL, Thurm AE, Jason LA. Chronic fatigue syndrome in children and adolescents: a review. *J Adolesc Health.* 1998;22(1):4-18.
7. Naviaux RK, Naviaux JC, Li K, Bright AT, Alaynick WA, Wang L, et al. Metabolic features of chronic fatigue syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(37):E5472-80.
8. Germain A, Ruppert D, Levine SM, Hanson MR. Metabolic profiling of a myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome discovery cohort reveals disturbances in fatty acid and lipid metabolism. *Mol Biosyst.* 2017;13(2):371-9.
9. Montoya JG, Holmes TH, Anderson JN, Maecker HT, Rosenberg-Hasson Y, Valencia IJ, et al. Cytokine signature associated with disease severity in chronic fatigue syndrome patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(34):E7150-E8.
10. Veeranki S, Winchester LJ, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia associated skeletal muscle weakness involves mitochondrial dysfunction and epigenetic modifications. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(5):732-41.
11. Rajeevan MS, Dimulescu I, Murray J, Falkenberg VR, Unger ER. Pathway-focused genetic evaluation of immune and inflammation related genes with chronic fatigue syndrome. *Hum Immunol.* 2015;76(8):553-60.
12. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol.* 2005;58(8):826-32.
13. Gerrity TR, Papanicolaou DA, Amsterdam JD, Bingham S, Grossman A, Hedrick T, et al. Immunologic aspects of chronic fatigue syndrome. Report on a Research Symposium convened by The CFIDS Association of America and co-sponsored by the US Centers for Disease Control and Prevention and the National Institutes of Health. *Neuroimmunomodulation.* 2004;11(6):351-7.
14. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G. Immunological aspects of chronic fatigue syndrome. *Autoimmun Rev.* 2009;8(4):287-91.
15. Yang J, Fang P, Yu D, Zhang L, Zhang D, Jiang X, et al. Chronic Kidney Disease Induces Inflammatory CD40+ Monocyte Differentiation via Homocysteine Elevation and DNA Hypomethylation. *Circ Res.* 2016;119(11):1226-41.

16. Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrehag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol*. 1997;26(4):301-7.
17. Awadalla P, Boileau C, Payette Y, Idaghmour Y, Goulet JP, Knoppers B, et al. Cohort profile of the CARTaGENE study: Quebec's population-based biobank for public health and personalized genomics. *Int J Epidemiol*. 2013;42(5):1285-99.
18. Godard B, Marshall J, Laberge C. Community engagement in genetic research: results of the first public consultation for the Quebec CARTaGENE project. *Community Genet*. 2007;10(3):147-58.
19. Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr*. 2006;136(6 Suppl):1731S-40S.
20. Liakishev AA. [Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease]. *Kardiologija*. 2006;46(5):70.
21. Mech AW, Farah A. Correlation of clinical response with homocysteine reduction during therapy with reduced B vitamins in patients with MDD who are positive for MTHFR C677T or A1298C polymorphism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry*. 2016;77(5):668-71.
22. Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, et al. Homocysteine and cognitive function in the elderly: the Rotterdam Scan Study. *Neurology*. 2002;59(9):1375-80.
23. Keshteli AH, Baracos VE, Madsen KL. Hyperhomocysteinemia as a potential contributor of colorectal cancer development in inflammatory bowel diseases: a review. *World J Gastroenterol*. 2015;21(4):1081-90.
24. Jelsness-Jorgensen LP, Bernklev T, Henriksen M, Torp R, Moum BA. Chronic fatigue is more prevalent in patients with inflammatory bowel disease than in healthy controls. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(7):1564-72.
25. Lerner AM, Dworkin HJ, Sayyed T, Chang CH, Fitzgerald JT, Beqaj S, et al. Prevalence of abnormal cardiac wall motion in the cardiomyopathy associated with incomplete multiplication of Epstein-barr Virus and/or cytomegalovirus in patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo*. 2004;18(4):417-24.
26. Oussalah A, Levy J, Filhine-Tresarrieu P, Namour F, Gueant JL. Association of TCN2 rs1801198 c.776G>C polymorphism with markers of one-carbon metabolism and related diseases: a systematic review and meta-analysis of genetic association studies. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(4):1142-56.
27. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *Am J Hum Genet*. 2009;84(4):477-82.
28. Zinck JW, de Groh M, MacFarlane AJ. Genetic modifiers of folate, vitamin B-12, and homocysteine status in a cross-sectional study of the Canadian population. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(6):1295-304.
29. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*. 2009;41(6):666-76.

30. Fedorowski A, Franceschini N, Brody J, Liu C, Verwoert GC, Boerwinkle E, et al. Orthostatic hypotension and novel blood pressure-associated gene variants: Genetics of Postural Hemodynamics (GPH) Consortium. *Eur Heart J*. 2012;33(18):2331-41.
31. Thomsen LC, McCarthy NS, Melton PE, Cadby G, Austgulen R, Nygard OK, et al. The antihypertensive MTHFR gene polymorphism rs17367504-G is a possible novel protective locus for preeclampsia. *J Hypertens*. 2017;35(1):132-9.
32. Ware JE, Jr., Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992;30(6):473-83.
33. Smets EM, Garssen B, Bonke B, De Haes JC. The Multidimensional Fatigue Inventory (MFI) psychometric qualities of an instrument to assess fatigue. *J Psychosom Res*. 1995;39(3):315-25.
34. McManimen SL, Jason LA. Post-Exertional Malaise in Patients with ME and CFS with Comorbid Fibromyalgia. *SRL Neurol Neurosurg*. 2017;3(1):22-7.
35. Murdock KW, Wang XS, Shi Q, Cleeland CS, Fagundes CP, Vernon SD. The utility of patient-reported outcome measures among patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Qual Life Res*. 2017;26(4):913-21.
36. Jason LA, Sunnquist M, Brown A, Furst J, Cid M, Farietta J, et al. Factor Analysis of the DePaul Symptom Questionnaire: Identifying Core Domains. *J Neurol Neurobiol*. 2015;1(4).
37. Schuster K, Bailey LB, Cerda JJ, Gregory JF, 3rd. Urinary 4-pyridoxic acid excretion in 24-hour versus random urine samples as a measurement of vitamin B6 status in humans. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(3):466-70.

Supplementary Table 1: Distribution of plasma tHcy concentration in ME patients and in healthy subjects according to polymorphisms of homocysteine metabolism pathway

SNP	GENE	GENOTYPE	ME patients with hypohomocysteinemia		ME patients with normal homocysteine levels		ME patients with hyperhomocysteinemia		All controls	
			Allelic frequency % (n)	tHcy (μmol/L)	Allelic frequency % (n)	tHcy (μmol/L)	Allelic frequency % (n)	tHcy (μmol/L)	Allelic frequency % (n)	tHcy (μmol/L)
rs3742801	ABCD4	GG	40% (12/30)	4,25 ± 0,97	31,82% (14/44)	9,64 ± 2,46	37,5% (9/24)	27,76 ± 12,10	46,15% (24/52)	9,16 ± 8,60
		AG	46,67% (14/30)	4,47 ± 1,23	45,45% (20/44)	9,23 ± 2,52	50% (12/24)	22,35 ± 6,41	42,31% (22/52)	8,48 ± 7,74
		AA	13,33% (4/30)	4,23 ± 0,96	22,73% (10/44)	10,98 ± 2,77	12,5% (3/24)	19,94 ± 4,10	5,77% (3/52)	9,06 ± 7,55
rs819147	AHCY	TT	77,78% (21/27)	4,59 ± 1,10	88,10% (37/42)	9,58 ± 2,58	68,42% (13/19)	22,98 ± 10,17	84,31% (43/51)	7,68 ± 7,29
		CT	18,52% (5/27)	3,71 ± 1,10	11,90% (5/42)	9,25 ± 2,65	31,58% (6/19)	23,03 ± 7,08	13,73% (7/51)	10,06 ± 6,03
		CC	3,70% (1/27)	4,51	-	-	-	-	1,96% (1/51)	5,55
rs819171	AHCY	AA	77,78% (21/27)	4,59 ± 1,10	85,71% (36/42)	9,61 ± 2,61	72,22% (13/18)	22,98 ± 10,17	84,31% (43/51)	7,68 ± 7,29
		AG	18,52% (5/27)	3,71 ± 1,10	14,29% (6/42)	9,15 ± 2,38	27,78% (5/18)	23,70 ± 7,70	13,73% (7/51)	10,06 ± 6,03
		GG	3,70% (1/27)	4,51	-	-	-	-	1,96% (1/51)	5,55
rs4780	B2M	TT	88,89% (24/27)	4,46 ± 1,11	83,33% (37/42)	9,47 ± 2,54	100% (19/19)	23,00 ± 9,10	98,04% (50/51)	7,94 ± 7,12
		CT	11,11% (3/27)	4,09 ± 1,31	16,67% (7/42)	9,93 ± 2,84	-	-	1,96% (1/51)	9,17
		CC	-	-	-	-	-	-	-	-
rs3733890	BHMT1	CC	44,44% (12/27)	4,33 ± 1,17	57,14% (24/42)	9,32 ± 2,33	36,84% (7/19)	25,69 ± 13,08	49,02% (25/51)	7,85 ± 7,31
		CT	40,74% (11/27)	4,36 ± 1,16	30,95% (13/42)	10,13 ± 3,35	52,63% (10/19)	22,15 ± 6,20	39,22% (20/51)	7,44 ± 6,85
		TT	14,81% (4/27)	4,86 ± 0,91	11,90% (5/42)	9,08 ± 0,82	10,53% (2/19)	17,83 ± 2,62	11,76% (6/51)	10,18 ± 7,46
rs567754	BHMT-02	GG	39,29% (11/28)	4,73 ± 0,98	58,14% (25/43)	9,54 ± 2,77	50% (12/24)	25,05 ± 7,80	46% (23/50)	8,04 ± 5,98
		AG	50% (14/28)	4,09 ± 1,07	23,26% (10/43)	10,06 ± 2,49	41,67% (10/24)	23,68 ± 11,18	32% (16/50)	7,48 ± 6,40
		AA	10,71 % (3/28)	3,73 ± 1,40	18,60% (8/43)	9,02 ± 2,01	8,33% (2/24)	20,30 ± 5,48	22% (11/50)	5,61 ± 9,87
rs651852	BHMT-08	AA	25 % (7/28)	4,12 ± 1,35	23,81% (10/42)	10,11 ± 2,23	20,83% (5/24)	26,61 ± 15,84	34% (17/50)	8,73 ± 8,22

<i>rs766173</i>		AG	39,29% (11/28)	3,97 ± 0,96	45,24% (19/42)	9,45 ± 2,83	54,17% (13/24)	23,24 ± 6,16	54% (27/50)	7,93 ± 6,85
		GG	35,71% (10/28)	4,81 ± 0,92	30,95% (13/42)	9,41 ± 2,57	25% (6/24)	23,79 ± 8,55	12% (6/50)	6,04 ± 3,17
	BRCA2	TT	96,30% (26/27)	4,47 ± 1,10	97,56% (40/41)	97,56 ± 2,62	83,33% (15/18)	24,06 ± 9,99	92,16% (47/51)	8,34 ± 7,21
		GT	3,70% (1/27)	3,03	2,44% (1/41)	8,65	16,67% (3/18)	18,89 ± 2,54	7,84% (4/51)	3,59 ± 1,95
		GG	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs121964962</i>	CBS	GG	100 % (28/28)	4,31 ± 1,09	100 % (43/43)	9,56 ± 2,55	100 % (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (50/50)	7,97 ± 6,98
		AG	-	-	-	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs121964971</i>	CBS	GG	100 % (28/28)	4,31 ± 1,09	100 % (43/43)	9,56 ± 2,55	100 % (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (50/50)	7,97 ± 6,98
		AG	-	-	-	-	-	-	-	-
		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs2124459</i>	CBS	TT	36,67% (11/30)	4,17 ± 1,12	39,53% (17/43)	10,34 ± 2,81	60,87% (14/23)	26,27 ± 10,80	23,53% (12/51)	9,22 ± 10,01
		CT	40,0% (12/30)	4,41 ± 0,85	51,16% (22/43)	9,57 ± 2,62	39,13% (9/23)	20,33 ± 4,28	62,75% (32/51)	8,33 ± 6,79
		CC	23,33% (7/30)	4,53 ± 1,42	9,30% (4/43)	8,71 ± 1,21	0	0	13,73% (7/51)	11,64 ± 10,07
<i>rs234709</i>	CBS	CC	37,04% (10/27)	4,57 ± 1,23	27,91% (12/43)	9,45 ± 1,87	35,00% (7/20)	25,12 ± 7,87	35,29% (18/51)	10,34 ± 7,42
		CT	44,44% (12/27)	4,22 ± 0,95	44,19% (19/43)	9,66 ± 2,80	40,0% (8/20)	21,36 ± 4,10	52,94% (27/51)	7,76 ± 7,15
		TT	18,52% (5/27)	4,05 ± 1,32	27,91% (12/43)	10,18 ± 3,09	25,0% (5/20)	26,73 ± 15,56	11,76% (6/51)	10,56 ± 13,03
<i>rs2851391</i>	CBS	CC	43,48% (10/23)	4,18 ± 1,10	21,62% (8/37)	7,45 ± 1,41	22,73% (5/22)	28,30 ± 14,97	41,67% (15/36)	10,47 ± 9,67
		CT	26,10% (6/23)	3,59 ± 1,19	62,16% (23/37)	10,62 ± 2,53	45,45% (10/22)	21,38 ± 4,59	41,67% (15/36)	7,25 ± 5,31
		TT	30,43% (7/23)	4,93 ± 0,75	16,22% (6/37)	9,31 ± 2,57	31,82% (7/22)	23,88 ± 8,90	16,67% (6/36)	7,17 ± 6,62
<i>rs28934891</i>	CBS	GG	100 % (28/28)	4,31 ± 1,09	100 % (43/43)	9,56 ± 2,55	100 % (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (50/50)	7,97 ± 6,98
			-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs28934892</i>	CBS	CC	100 % (28/28)	4,31 ± 1,09	100 % (43/43)	9,56 ± 2,55	100 % (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (50/50)	7,97 ± 6,98
			-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs4920037</i>	CBS	CC	66,67% (20/30)	4,31 ± 1,05	52,27% (23/44)	9,31 ± 2,32	58,33% (14/24)	25,35 ± 10,42	75% (39/52)	8,94 ± 7,51

<i>rs5742905</i>		CT	26,67% (8/30)	4,17 ± 1,13	43,18% (19/44)	10,48 ± 2,84	25,0% (6/24)	22,39 ± 5,63	25% (13/52)	8,63 ± 9,60
		TT	6,67% (2/30)	5,47 ± 0,52	4,55% (2/44)	8,10 ± 2,04	16,67% (4/24)	22,19 ± 8,98		
	CBS	AA	95,65% (22/23)	4,47 ± 1,09	100% (39/39)	9,52 ± 2,61	94,44% (17/18)	21,54 ± 5,17	97,56% (40/41)	8,81 ± 7,59
		AG	4,35% (1/23)	3,03	-	-	5,56% (1/18)	54,37	2,44% (1/41)	7,84
		GG	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs602662</i>	CBS	CC	30% (9/30)	4,45 ± 1,15	18,60% (8/43)	9,22 ± 2,43	21,74% (5/23)	27,50 ± 7,75	30,77% (16/52)	7,35 ± 5,12
		CT	53,33% (16/30)	4,34 ± 1,15	53,49% (23/43)	10,14 ± 2,67	60,87% (14/23)	24,53 ± 10,26	51,92% (27/52)	10,48 ± 9,84
		TT	16,67% (5/30)	4,20 ± 0,79	27,91% (12/43)	9,53 ± 2,72	17,39% (4/23)	20,13 ± 4,98	17,31% (9/52)	6,7 ± 4,90
<i>rs6586282</i>	CBS	CC	66,67% (20/30)	4,62 ± 1,12	60,47% (26/43)	9,71 ± 2,45	66,67% (16/24)	23,39 ± 7,43	55,77% (29/52)	10,11 ± 8,46
		CT	26,67% (8/30)	3,77 ± 0,68	34,88% (15/43)	10,03 ± 2,87	29,17% (7/24)	21,33 ± 3,19	44,23% (23/52)	7,28 ± 7,22
		TT	6,67% (2/30)	3,96 ± 1,31	4,62% (2/43)	9,14 ± 4,34	4,17% (1/24)	54,37		
<i>rs1801181</i>	CBS A360A	GG	46,43 % (13/28)	4,50 ± 1,01	41,86% (18/43)	10,01 ± 2,88	58,33 % (14/24)	26,27 ± 10,80	32% (16/50)	6,54 ± 5,00
		AG	32,14 % (9/28)	4,31 ± 0,97	48,84 % (21/43)	9,43 ± 2,38	33,33 % (8/24)	20,20 ± 4,55	58% (29/50)	8,16 ± 7,28
		AA	21,43% (6/28)	3,89 ± 1,45	9,30 % (4/43)	8,23 ± 1,57	8,33 % (2/24)	24,32 ± 4,06	10% (5/50)	11,47 ± 10,35
<i>rs234706</i>	CBS C699T	GG	46,43 % (13/28)	4,21 ± 1,20	44,19 % (19/43)	9,17 ± 1,92	52,17 % (12/23)	25,37 ± 11,32	52% (26/50)	9,58 ± 8,52
		AG	39,29 % (11/28)	4,27 ± 0,98	30,23 % (13/43)	9,64 ± 2,82	21,74 % (5/23)	22,62 ± 4,80	40% (20/50)	6,47 ± 4,63
		AA	14,29 % (4/28)	4,73 ± 1,16	25,58 % (11/43)	10,15 ± 3,24	26,09 % (6/23)	21,64 ± 7,16	8% (4/50)	5,02 ± 2,20
<i>rs41281112</i>	CLYBL	CC	100% (30/30)	4,35 ± 1,07	95,45% (42/44)	9,86 ± 2,60	95,65% (22/23)	23,84 ± 9,39	96,15% (50/52)	8,74 ± 8,10
		CT	-	-	4,55% (2/44)	7,57 ± 0,91	4,35% (1/23)	26,26	3,85% (2/52)	11,76 ± 4,19
<i>rs165774</i>	COMT	GG	40,74% (11/27)	4,59 ± 1,19	47,62% (20/42)	10,29 ± 2,59	42,11% (8/19)	22,67 ± 13,30	52,94% (27/51)	8,06 ± 8,29
		AG	55,56% (15/27)	4,21 ± 1,04	47,62% (20/42)	8,93 ± 2,47	47,37% (9/19)	24,12 ± 5,14	43,14% (22/51)	7,91 ± 5,65
		AA	3,70% (1/27)	5,70	4,72% (2/42)	8,12 ± 1,70	10,53% (2/19)	19,27 ± 1,10	3,92% (2/51)	7,18 ± 5,23
<i>rs4633</i>	COMT	CC	18,52% (5/27)	3,96 ± 1,25	30,95% (13/42)	10,27 ± 2,63	21,05% (4/19)	16,36 ± 1,37	15,69% (8/51)	8,95 ± 11,22
		CT	62,96% (17/27)	4,49 ± 1,09	52,38% (22/42)	9,21 ± 2,65	47,37% (9/19)	24,80 ± 11,49	66,67% (34/51)	7,96 ± 6,45
		TT	18,52% (5/27)	4,63 ± 1,15	16,67% (7/42)	9,24 ± 2,18	31,58% (6/19)	24,71 ± 6,43	17,65% (9/51)	7,10 ± 5,24
<i>rs4680</i>	COMT	CC	13,04 % (3/23)	3,16 ± 0,49	37,84 % (14/37)	10,52 ± 2,43	22,22 % (4/18)	16,36 ± 1,37	19,51% (8/41)	5,89 ± 3,07

rs4646312		CT	65,22 % (15/23)	4,28 ± 1,08	51,35 % (19/37)	9,07 ± 2,46	50,00 % (9/18)	28,75 ± 11,42	65,85% (27/41)	8,22 ± 6,81
		TT	21,74 % (5/23)	4,71 ± 1,00	10,81 % (4/37)	8,81 ± 2,74	27,78 % (5/18)	22,58 ± 4,20	14,63% (6/41)	7,00 ± 6,31
	COMT	AA	25,93% (7/27)	4,60 ± 1,21	26,83% (11/41)	9,18 ± 2,24	36,84% (7/19)	23,94 ± 6,21	25,49% (13/51)	6,19 ± 4,76
		AG	59,26% (16/27)	4,58 ± 1,07	53,66% (22/41)	9,34 ± 2,57	47,37% (9/19)	24,48 ± 11,70	60,78% (31/51)	8,36 ± 6,55
		GG	14,81% (4/27)	3,50 ± 0,79	19,51% (8/41)	10,28 ± 3,09	15,79% (3/19)	16,33 ± 1,68	13,73% (7/51)	9,48 ± 12,01
rs1021737	CTH	GG	55,56% (15/27)	4,85 ± 1,06	57,5% (23/40)	9,33 ± 2,96	52,63% (10/21)	22,40 ± 6,10	52,94% (27/51)	7,85 ± 7,49
		GT	33,33% (9/27)	3,85 ± 0,86	42,5% (17/40)	9,69 ± 2,06	42,11% (8/21)	24,12 ± 12,73	47,06% (24/51)	8,10 ± 6,68
		TT	11,11% (3/27)	3,97 ± 1,39	0	0	5,26% (1/21)	19,97	0	
rs12517451	DHFR	CC	63,33% (19/30)	4,16 ± 1,09	41,86% (18/43)	9,53 ± 2,47	66,67% (16/24)	24,84 ± 10,78	47,06% (24/51)	9,44 ± 7,92
		CT	30% (9/30)	4,81 ± 0,99	51,16% (22/43)	10,27 ± 2,76	33,33% (8/24)	22,56 ± 3,66	45,10% (23/51)	8,65 ± 8,61
		TT	6,67% (2/30)	4,11 ± 1,10	6,98% (3/43)	7,99 ± 1,66	0	0	7,84% (4/51)	7,95 ± 6,66
rs1126464	DPEP1	GG	66,67% (20/30)	4,44 ± 1,16	75% (33/44)	10,06 ± 2,73	69,57% (16/23)	24,99 ± 10,48	59,62% (31/52)	9,97 ± 9,16
		CG	30% (9/30)	4,10 ± 0,92	25% (11/44)	8,87 ± 1,96	26,09% (6/23)	23,01 ± 5,74	30,77% (16/52)	7,05 ± 5,21
		CC	3,33% (1/30)	4,88	0	0	4,35% (1/23)	19,97	9,62% (5/52)	7,76 ± 7,59
rs154657	DPEP1	AA	30% (9/30)	4,31 ± 1,06	27,27% (12/44)	11,22 ± 2,49	29,17% (7/24)	28,25 ± 8,51	26,92% (14/52)	7,27 ± 4,63
		AG	53,33% (16/30)	4,28 ± 1,09	50% (22/44)	9,64 ± 2,62	41,67% (10/24)	19,71 ± 3,53	50% (26/52)	9,28 ± 8,66
		GG	16,67% (5/30)	4,64 ± 1,21	22,73% (10/44)	8,26 ± 1,75	29,17% (7/24)	26,15 ± 12,76	23,08% (12/52)	9,8 ± 9,77
rs202700	FOLH1	CC	50% (15/30)	4,51 ± 1,02	63,64% (28/44)	9,54 ± 2,27	43,48% (10/23)	27,49 ± 11,14	51,92% (27/52)	9,03 ± 8,51
		CT	33,33% (10/30)	4,03 ± 0,94	29,55% (13/44)	9,99 ± 3,10	47,83% (11/23)	20,25 ± 5,43	38,46% (20/52)	9,41 ± 8,22
		TT	16,67% (5/30)	4,53 ± 1,51	6,82% (3/44)	10,80 ± 3,71	8,70% (2/23)	22,26 ± 5,66	9,62% (5/52)	5,76 ± 2,83
rs2071010	FOLR1	CC	92,86 % (26/28)	4,39 ± 1,08	81,40 % (35/43)	9,55 ± 2,46	91,67 % (22/24)	23,85 ± 9,39	94% (46/49)	7,88 ± 6,98
		CT	7,14 % (2/28)	3,26 ± 0,21	18,60 % (8/43)	9,60 ± 3,10	8,33 % (2/24)	26,67 ± 0,57	6% (3/49)	10,83 ± 8,52
		TT	-	-	-	-	-	-	-	-
rs651933	FOLR2	CC	21,43% (6/28)	4,44 ± 0,86	18,60% (8/43)	9,05 ± 3,09	37,50% (9/24)	21,90 ± 6,79	34,69% (17/49)	8,06 ± 7,18
		CT	50% (14/28)	4,58 ± 1,13	53,49% (23/43)	9,78 ± 2,57	58,33% (14/24)	25,77 ± 10,37	51,02% (25/49)	6,99 ± 5,31
		TT	28,57% (8/28)	3,72 ± 1,04	27,91% (12/43)	9,49 ± 2,30	4,17% (1/24)	19,97	14,29% (7/49)	11,94 ± 10,99
rs7925545	FOLR3	TT	88,89% (24/27)	4,25 ± 1,09	92,68% (38/41)	9,33 ± 2,50	100% (23/23)	23,59 ± 8,88	97,73% (43/44)	8,26 ± 7,33

<i>rs1047781</i>		CT	11,11% (3/27)	5,18 ± 0,51	7,32% (3/41)	12,18 ± 2,30	-	-	2,27% (1/44)	5,55
		CC	-	-	-	-	-	-	-	-
	FUT2	AA	100% (30/30)	4,35 ± 1,07	100% (44/44)	9,76 ± 2,59	100% (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (52/52)	8,86 ± 7,99
			-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs281379</i>	FUT2	GG	30% (9/30)	4,45 ± 1,15	20,45% (9/44)	9,36 ± 2,31	26,09% (6/23)	28,01 ± 7,04	36,54% (19/52)	6,95 ± 4,94
		AG	53,33% (16/30)	4,34 ± 1,15	52,27% (23/44)	10,03 ± 2,70	65,22% (15/23)	23,13 ± 10,07	44,23% (23/52)	10,09 ± 8,84
		AA	16,67% (5/30)	4,20 ± 0,79	27,27% (12/44)	9,53 ± 2,72	13,04% (2/23)	23,25 ± 5,57	19,23% (10/52)	9,66 ± 10,45
	FUT2	TT	30% (9/30)	4,45 ± 1,15	25% (11/44)	9,44 ± 2,36	25,0% (6/24)	31,98 ± 12,98	37,25% (19/51)	6,98 ± 4,91
<i>rs492602</i>		CT	53,33% (16/30)	4,34 ± 1,15	50% (22/44)	10,20 ± 2,74	66,67% (16/24)	21,95 ± 5,66	45,10% (23/51)	11,55 ± 10,24
		CC	16,67% (5/30)	4,20 ± 0,79	25% (11/44)	9,19 ± 2,58	8,33% (2/24)	17,42 ± 2,67	17,65% (9/51)	6,70 ± 4,90
	FUT2	GG	34,78% (8/23)	4,28 ± 1,10	29,41% (10/34)	9,52 ± 2,47	28,57% (6/21)	31,98 ± 12,98	45,24% (19/42)	6,98 ± 4,91
		AG	56,52% (13/23)	4,33 ± 1,20	44,12% (15/34)	10,04 ± 2,76	61,90% (13/21)	21,87 ± 5,57	40,48% (17/42)	14,08 ± 10,80
<i>rs601338</i>		AA	8,70% (2/23)	4,70 ± 0,26	26,47% (9/34)	9,10 ± 2,56	9,52% (2/21)	17,42 ± 2,67	14,29% (6/42)	5,92 ± 5,35
	FUT6	CC	93,10% (27/29)	4,35 ± 1,07	90,90% (40/44)	9,91 ± 2,65	95,83% (23/24)	23,99 ± 9,20	94,23% (49/52)	8,92 ± 8,20
		CA	6,90 (2/29)	3,63 ± 0,11	90,09% (4/44)	8,28 ± 1,27	4,17% (1/24)	26,26	5,77% (3/52)	7,92 ± 3,42
		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs708686</i>	FUT6	CC	50% (15/30)	4,44 ± 1,01	38,64% (17/44)	10,78 ± 2,95	41,67% (10/24)	22,73 ± 7,22	46,15% (24/52)	9,64 ± 6,82
		CT	46,67% (14/30)	4,15 ± 1,11	50% (22/44)	9,50 ± 2,11	50,0% (12/24)	24,37 ± 10,65	34,62% (24/52)	10,29 ± 10,58
		TT	3,33% (1/30)	5,84	11,36% (5/44)	7,40 ± 1,41	8,33% (2/24)	29,11 ± 8,84	19,23% (10/52)	4,43 ± 1,92
	FUT6	GG	35% (7/20)	4,76 ± 0,72	35,71% (15/42)	11,84 ± 2,20	56,52% (13/23)	22,35 ± 6,70	45,10% (23/51)	9,85 ± 7,08
<i>rs778805</i>		AG	55% (11/20)	4,12 ± 1,24	52,38% (22/42)	8,84 ± 2,29	30,43% (7/23)	27,00 ± 13,76	33,33% (17/51)	8,14 ± 8,26
		AA	10% (2/20_)	4,59 ± 1,77	11,90% (5/42)	7,93 ± 1,29	13,04% (3/23)	23,75 ± 6,41	21,57% (11/51)	8,54 ± 9,89
	FUT6	CC	96,3% (26/27)	4,39 ± 1,07	97,73% (43/44)	9,83 ± 2,58	95,83% (23/24)	23,99 ± 9,20	97,96% (48/49)	8,54 ± 7,15
		CT	3,7% (1/27)	3,7	2,27% (1/44)	6,81	4,17% (1/24)	26,26	2,04% (1/49)	6,36
<i>rs78060698</i>		TT	-	-	-	-	-	-	-	-
	GGH	GG	65,52% (19/29)	4,36 ± 1,05	59,52% (25/42)	10,00 ± 2,61	65,22% (15/23)	24,05 ± 10,02	42,31% (22/52)	9,99 ± 9,72

rs558660		AG	27,59% (8/29)	4,44 ± 1,09	30,95% (13/42)	9,52 ± 2,79	34,78% (8/23)	22,73 ± 6,75	48,08% (25/52)	8,41 ± 6,93
		AA	6,90% (2/29)	3,22 ± 0,68	9,52% (4/42)	10,38 ± 2,06	-	-	9,62% (5/52)	6,15 ± 3,39
	GIF	CC	80% (24/30)	4,21 ± 1,10	75% (33/44)	9,81 ± 2,70	54,17% (13/24)	22,56 ± 6,43	69,23% (36/52)	10,37 ± 8,24
		CT	20% (6/30)	4,90 ± 0,79	20,45% (9/44)	10,02 ± 2,35	45,83% (11/24)	25,87 ± 11,43	28,85% (15/52)	5,58 ± 6,57
		TT	-	-	4,55% (2/44)	7,81 ± 1,41	-	-	1,92% (1/52)	3,5
rs2251468	HFN1A	AA	30% (9/30)	4,68 ± 0,89	40,91% (18/44)	9,11 ± 2,89	45,83% (11/24)	24,56 ± 10,75	32,69% (17/52)	9,80 ± 9,85
		AC	60% (18/30)	4,35 ± 1,09	50% (22/44)	10,28 ± 2,28	33,33% (8/24)	25,41 ± 7,24	59,62% (31/52)	8,01 ± 7,11
		CC	10% (3/30)	3,38 ± 1,17	9,09% (4/44)	9,78 ± 2,83	20,83% (5/24)	20,91 ± 8,32	7,69% (4/52)	11,49 ± 6,27
rs2270655	MMA	CC	93,33% (28/30)	4,31 ± 1,10	84,09% (37/44)	9,81 ± 2,66	100% (24/24)	24,08 ± 9,01	90,38% (47/52)	8,71 ± 8,18
		CG	6,67% (2/30)	4,88 ± 0	15,91% (7/44)	9,50 ± 2,37	-	-	9,62% (5/52)	10,27 ± 6,36
		GG	-	-	-	-	-	-	-	-
rs10515552	MS4A3	AA	90% (27/30)	4,33 ± 1,06	93,18% (41/44)	9,75 ± 2,61	95,83% (23/24)	24,26 ± 9,17	90,38% (47/52)	8,67 ± 7,15
		AG	10% (3/30)	4,51 ± 1,38	6,82% (3/44)	9,81 ± 2,81	4,17% (1/24)	19,97	9,62% (5/52)	10,66 ± 14,85
		GG	-	-	-	-	-	-	-	-
rs2298585	MS4A3	GG	100% (30/30)	4,35 ± 1,07	97,73% (43/44)	9,83 ± 2,57	100% (24/24)	24,08 ± 9,01	98,08% (51/52)	8,98 ± 8,02
		AG	-	-	2,27% (1/44)	5,68	-	-	1,92% (1/52)	2,74
		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
rs1076991	MTHFD1	CC	28,57% (8/28)	3,90 ± 1,24	13,95% (6/43)	9,81 ± 2,33	35,29% (6/17)	21,76 ± 4,75	32,65% (16/49)	9,54 ± 8,99
		CT	46,43% (13/28)	4,55 ± 0,95	48,84% (21/43)	9,84 ± 2,67	64,71% (11/17)	21,00 ± 5,99	44,90% (22/49)	6,94 ± 5,73
		TT	25% (7/28)	4,32 ± 1,17	37,21% (16/43)	9,10 ± 2,56	35,29% (6/17)	30,97 ± 13,65	22,45% (11/49)	7,92 ± 6,47
rs2236225	MTHFD1	CC	37,04% (10/27)	4,34 ± 1,07	45,24% (19/42)	9,15 ± 2,51	26,32% (5/19)	20,26 ± 4,88	37,25% (19/51)	7,48 ± 8,49
		CT	51,85% (14/27)	4,48 ± 1,13	35,71% (15/42)	9,95 ± 2,76	47,37% (9/19)	26,50 ± 12,05	50,98% (26/51)	7,72 ± 5,81
		TT	11,11% (3/27)	4,41 ± 1,56	19,05% (8/42)	9,71 ± 2,47	26,32% (5/19)	19,43 ± 2,35	11,76% (6/51)	10,53 ± 7,77
rs17349743	MTHFD1L	TT	50,00% (14/28)	4,23 ± 1,07	62,79% (27/43)	9,55 ± 2,58	45,83% (11/24)	23,93 ± 7,41	64% (32/50)	6,88 ± 4,64
		CT	42,86% (12/28)	4,62 ± 1,04	27,91% (12/43)	9,30 ± 2,27	41,67% (10/24)	25,86 ± 11,46	30% (15/50)	11,18 ± 10,22
		CC	7,14% (2/28)	2,93 ± 0,26	9,30% (4/43)	10,41 ± 3,63	12,50% (3/24)	18,71 ± 2,78	6% (3/50)	3,63 ± 1,46
rs6922269	MTHFD1L	GG	62,96% (17/27)	4,23 ± 1,05	69,05% (29/42)	9,58 ± 2,54	36,36% (8/22)	28,20 ± 12,42	60,42% (29/48)	8,02 ± 6,29

rs803422		AG	37,04% (10/27)	4,38 ± 1,23	26,19% (11/42)	10,01 ± 2,81	63,64% (14/22)	20,09 ± 3,54	37,50% (18/48)	7,90 ± 8,56
		AA	-	-	4,76%(2/42)	7,69 ± 1,36	-	-	2,08% (1/48)	4,66
	MTHFD1L	CC	48,15% (13/27)	4,04 ± 1,14	46,34% (19/41)	10,69 ± 2,59	54,17% (13/24)	22,21 ± 10,03	40,82% (20/49)	6,41 ± 2,99
		CT	37,04% (10/27)	4,31 ± 0,97	46,34% (19/41)	8,37 ± 1,99	41,67% (10/24)	26,56 ± 7,45	42,86% (21/49)	7,74 ± 6,31
		TT	14,81% (4/27)	5,01 ± 1,24	7,32% (3/41)	9,40 ± 2,74	4,17% (1/24)	16,42	16,33% (8/49)	9,93 ± 11,48
rs114673809	MTHFR	CC	100% (27/27)	4,42 ± 1,11	100% (42/42)	9,54 ± 2,56	100% (19/19)	23,00 ± 9,10	100% (51/51)	7,96 ± 7,05
			-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-
rs1801131	MTHFR	AA	48,15% (13/27)	4,26 ± 1,30	47,62% (20/42)	9,42 ± 2,37	68,42% (13/19)	22,90 ± 10,25	50,98% (26/51)	8,32 ± 7,82
		CA	40,74% (11/27)	4,81 ± 0,78	35,71% (15/42)	10,11 ± 3,18	26,32% (5/19)	23,83 ± 7,38	43,14% (22/51)	7,74 ± 6,67
		CC	11,11% (3/27)	3,72 ± 1,00	16,67% (7/42)	8,69 ± 1,26	5,26% (1/19)	20,05	5,88% (3/51)	6,48 ± 2,74
rs1801133	MTHFR	AA	7,69% (2/26)	4,70 ± 1,41	9,52% (4/42)	8,53 ± 2,07	15,79% (3/19)	29,75 ± 21,44	17,65% (9/51)	6,64 ± 4,99
		AG	38,46% (10/26)	4,64 ± 1,23	52,38% (22/42)	9,66 ± 2,87	31,58% (6/19)	23,55 ± 6,90	49,02% (25/51)	8,14 ± 7,68
		GG	53,85% (14/26)	4,16 ± 1,04	38,10% (16/42)	9,63 ± 2,28	52,63% (10/19)	20,64 ± 3,94	33,33% (17/51)	8,41 ± 7,31
rs2066470	MTHFR	GG	89,29% (25/28)	4,29 ± 1,10	86,05%(37/43)	9,69 ± 2,63	95,65% (22/23)	23,73 ± 9,02	72,55% (37/51)	8,31 ± 7,01
		AG	7,14% (2/28)	4,26 ± 1,52	11,63% (5/43)	8,70 ± 2,18	4,35% (1/23)	19,97	27,45% (14/51)	6,89 ± 6,81
		AA	3,57% (1/28)	4,88	2,33% (1/43)	9,25	-	-	-	-
rs2274976	MTHFR	CC	88,89% (24/27)	4,31 ± 1,12	92,86% (39/42)	9,69 ± 2,58	100% (19/19)	23,00 ± 9,10	86,27% (44/51)	8,27 ± 7,46
		CT	7,41% (2/27)	5,59 ± 0,36	7,14% (3/42)	7,69 ± 1,39	-	-	13,73% (7/51)	6,06 ± 3,39
		TT	3,70% (1/27)	4,88	-	-	-	-	-	-
rs12085006	MTHFR	TT	21,43% (6/28)	4,45 ± 1,09	25,58% (11/43)	9,99 ± 2,79	22,73% (5/22)	32,08 ± 15,49	36,73% (18/49)	7,70 ± 5,29
		CT	53,57% (15/28)	4,32 ± 1,07	44,19% (19/43)	9,49 ± 2,74	54,55% (12/22)	21,71 ± 4,38	36,73% (18/49)	10,33 ± 9,48
		CC	25% (7/28)	4,06 ± 1,17	30,23% (13/43)	10,09 ± 2,39	22,73% (5/22)	23,82 ± 7,78	26,53% (13/49)	9,29 ± 9,67
rs12134663	MTHFR	TT	76,67% (23/30)	4,27 ± 1,15	75% (33/44)	9,30 ± 2,40	78,26% (18/23)	24,29 ± 9,82	82,69% (43/52)	8,87 ± 8,47
		TG	23,33% (7/30)	4,60 ± 0,76	20,45% (9/44)	11,33 ± 3,04	21,74% (5/23)	24,13 ± 7,21	11,54% (6/52)	10,52 ± 5,86
		GG	-	-	4,55% (2/44)	10,17 ± 0,37	-	-	5,77% (3/52)	5,42 ± 2,82
rs1999594	MTHFR	TT	25,93% (7/27)	4,06 ± 1,17	23,68% (9/38)	9,17 ± 2,23	26,09% (6/23)	22,59 ± 7,58	26,67% (12/45)	6,99 ± 5,20

<i>rs4846049</i>		CT	55,56% (15/27)	4,42 ± 1,04	47,37% (18/38)	9,40 ± 2,70	52,17% (12/23)	21,83 ± 4,35	42,22% (19/45)	9,77 ± 9,34
		CC	18,52% (5/27)	4,63 ± 1,12	28,95% (11/38)	9,99 ± 2,79	21,74% (5/23)	32,08 ± 15,49	31,11% (14/45)	8,82 ± 5,48
	MTHFR	AA	10,71% (3/28)	3,72 ± 1,00	18,60% (8/43)	9,31 ± 1,57	4,17% (1/24)	20,05	10,20% (5/49)	8,76 ± 6,71
		AC	35,71% (10/28)	4,78 ± 0,67	34,88(15/43)	9,95 ± 3,01	25% (6/24)	23,43 ± 6,67	40,82% (20/49)	7,19 ± 6,17
		CC	53,57% (15/28)	4,11 ± 1,27	46,51% (20/43)	9,37 ± 2,57	70,83% (17/24)	24,55 ± 10,07	48,98% (24/49)	8,53 ± 7,95
<i>rs1801394</i>	MTRR	CC	32,14% (9/28)	4,41 ± 1,05	25,58% (11/43)	8,21 ± 2,12	16,66% (4/24)	28,42 ± 6,57	28,57% (14/49)	8,98 ± 7,99
		CT	53,57% (15/28)	4,38 ± 1,06	53,49% (23/43)	10,02 ± 2,71	62,50% (15/24)	24,77 ± 10,29	48,98% (24/49)	9,07 ± 7,57
		TT	14,29% (4/28)	3,77 ± 1,40	20,93% (9/43)	10,06 ± 2,22	20,83% (5/24)	18,53 ± 2,12	22,45% (11/49)	4,44 ± 2,29
<i>rs1802059</i>	MTRR	CC	28,57% (8/28)	4,38 ± 1,34	60,47% (26/43)	9,86 ± 2,64	37,50% (9/24)	23,47 ± 6,40	46% (23/50)	6,83 ± 7,18
		CT	53,57% (15/28)	4,35 ± 0,91	34,88% (15/43)	8,87 ± 2,36	54,17% (13/24)	25,36 ± 10,93	42% (21/50)	9,23 ± 6,61
		TT	17,86% (5/28)	4,04 ± 1,35	4,65% (2/43)	10,86 ± 2,85	8,33% (2/24)	18,49 ± 4,19	12% (6/50)	7,96 ± 7,94
<i>rs1805087</i>	MTR	AA	62,96% (17/27)	4,33 ± 1,16	53,66% (22/41)	9,44 ± 2,61	78,95% (15/19)	23,14 ± 9,48	64,71% (33/51)	9,11 ± 8,14
		AG	37,04% (10/27)	4,58 ± 1,07	39,02% (16/41)	10,00 ± 2,73	21,05% (4/19)	22,45 ± 8,76	33,33% (17/51)	5,53 ± 3,62
		GG	-	-	7,32% (3/41)	7,90 ± 0,94	-	-	1,96% (1/51)	11,47
<i>rs12060264</i>	MTR	CC	61,54% (16/26)	4,71 ± 0,91	41,03% (16/39)	10,02 ± 2,42	16,67% (4/24)	32,52 ± 14,81	36,96% (17/46)	11,20 ± 9,35
		CT	38,46% (10/26)	4,12 ± 1,28	46,15% (18/39)	9,18 ± 2,84	54,17% (13/24)	22,02 ± 7,45	47,83% (22/46)	6,41 ± 4,67
		TT	19,23% (5/26)	4,48 ± 1,03	12,82% (5/39)	1012 ± 2,32	29,17% (7/24)	23,08 ± 5,71	15,22% (7/46)	8,84 ± 6,79
<i>rs2275565</i>	MTR	CC	64% (16/25)	4,17 ± 1,10	55% (22/40)	9,79 ± 2,68	68,18% (15/22)	24,51 ± 10,01	66,67% (28/42)	9,08 ± 8,36
		CA	36% (9/25)	5,06 ± 0,77	40% (16/40)	9,57 ± 2,53	31,82% (7/22)	22,12 ± 6,95	30,95% (13/42)	8,17 ± 5,35
		AA	-	-	5% (2/40)	7,86 ± 1,33	-	-	2,38% (1/42)	11,47
<i>rs162036</i>	MTRR	TT	77,78% (21/27)	4,51 ± 1,10	78,57% (33/42)	9,58 ± 2,55	68,42% (13/19)	24,22 ± 10,50	80,36% (41/51)	8,54 ± 7,28
		CT	18,52% (5/27)	4,25 ± 1,24	16,67% (7/42)	9,09 ± 2,70	26,32% (5/19)	20,48 ± 5,13	19,61% (10/51)	5,59 ± 5,75
		CC	3,70% (1/27)	3,33	4,76% (2/42)	10,47 ± 3,61	5,26% (1/19)	19,68	-	-
<i>rs2287780</i>	MTRR	CC	96,30% (26/27)	4,45 ± 1,12	97,62% (41/42)	9,59 ± 2,58	100% (18/18)	23,20 ± 9,32	95,92% (47/51)	7,28 ± 5,91
		CT	3,70% (1/27)	3,68	2,38% (1/42)	7,77	-	-	4,08% (2/49)	9,18 ± 7,01
		TT	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rs7703033</i>	MTRR	GG	29,17% (7/24)	3,95 ± 0,99	32,5% (13/40)	10,15 ± 2,37	38,10% ± (8/21)	21,78 ± 6,62	45% (15/42)	7,57 ± 6,77

<i>rs1141321</i>		AG	58,33% (14/24)	4,60 ± 0,84	52,5% (21/40)	9,55 ± 3,08	52,38% (11/21)	26,18 ± 11,60	35% (20/42)	10,30 ± 8,49
		AA	12,5% (3/24)	3,99 ± 1,54	15% (6/40)	9,82 ± 1,86	9,52% (2/21)	28,87 ± 2,38	20%(7/42)	10,13 ± 12,59
	MUT	GG	43,33% (13/30)	4,23 ± 1,24	43,18% (19/44)	10,23 ± 2,51	54,17% (13/24)	20,97 ± 4,63	55,77% (29/52)	8,35 ± 9,32
		AG	43,33% (13/30)	4,38 ± 1,20	47,73% (21/44)	9,56 ± 2,75	41,67% (10/24)	29,01 ± 11,36	38,46% (20/52)	9,09 ± 5,68
<i>rs4267943</i>		AA	13,33% (4/30)	4,66 ± 1,13	9,09% (4/44)	8,57 ± 2,02	4,17% (1/24)	15,21	5,77% (3/52)	12,28 ± 9,03
		TT	37,04% (10/27)	4,62 ± 0,89	39,02% (16/41)	10,12 ± 2,85	56,52% (13/23)	26,13 ± 10,57	28,26% (13/46)	9,11 ± 9,08
	MUT	CT	48,15% (13/27)	4,28 ± 1,16	48,78% (20/41)	9,71 ± 2,50	39,13% (9/23)	22,81 ± 6,50	50% (23/46)	9,27 ± 8,08
		CC	14,81% (4/27)	3,58 ± 0,14	12,20% (5/41)	9,13 ± 2,60	4,35% (1/23)	15,21	21,74% (10/46)	7,02 ± 5,61
<i>rs9369898</i>		TT	46,43% (13/28)	4,12 ± 1,17	32,56% (14/43)	9,31 ± 2,15	20,83% (5/24)	21,74 ± 7,84	36,54% (19/52)	10,49 ± 8,25
		CT	39,29% (11/28)	4,57 ± 1,10	44,19% (19/43)	9,88 ± 2,97	58,33% (14/24)	26,57 ± 10,09	46,15% (24/52)	8,67 ± 8,91
	MUT	CC	14,29% (4/28)	4,46 ± 0,79	23,26% (10/43)	9,91 ± 2,57	20,83% (5/24)	19,44 ± 4,31	17,31% (9/52)	5,90 ± 3,04
		GG	40,74% (11/27)	4,37 ± 0,94	43,90% (18/41)	10,35 ± 2,53	56,52% (13/26)	20,97 ± 4,63	57,45% (27/47)	7,46 ± 7,78
<i>rs9473555</i>		CG	44,44% (12/27)	4,49 ± 1,23	46,36% (19/41)	9,37 ± 2,82	39,13% (9/26)	28,30 ± 11,82	38,30% (18/47)	8,94 ± 5,96
		CC	14,81% (4/27)	4,66 ± 1,13	9,76% (4/41)	8,57 ± 2,02	4,35% (1/23)	15,21	4,26% (2/47)	16,69 ± 6,85
	MUT	GG	40,74% (11/27)	4,37 ± 0,94	43,90% (18/41)	10,35 ± 2,53	56,52% (13/26)	20,97 ± 4,63	57,45% (27/47)	7,46 ± 7,78
		CG	44,44% (12/27)	4,49 ± 1,23	46,36% (19/41)	9,37 ± 2,82	39,13% (9/26)	28,30 ± 11,82	38,30% (18/47)	8,94 ± 5,96
<i>rs11018628</i>		CC	14,81% (4/27)	4,66 ± 1,13	9,76% (4/41)	8,57 ± 2,02	4,35% (1/23)	15,21	4,26% (2/47)	16,69 ± 6,85
		TT	92,59% (25/27)	4,32 ± 1,06	97,56% (40/41)	9,76 ± 2,56	90,91% (20/22)	23,93 ± 9,31	88,46% (46/52)	8,78 ± 8,39
	NOX4	CT	7,41% (2/27)	3,96 ± 0,78	2,44% (1/41)	12,87	9,09% (2/22)	27,15 ± 12,24	11,54% (6/52)	9,51 ± 3,99
		CC								
<i>rs957140</i>		GG	21,74% (5/23)	4,62 ± 1,52	27,03% (10/37)	9,56 ± 2,58	31,82% (7/22)	23,80 ± 4,54	22,5% (9/40)	9,01 ± 6,12
		AG	60,87% (14/23)	4,35 ± 0,79	51,35% (19/37)	9,84 ± 2,57	45,45% (10/22)	21,40 ± 7,83	55% (22/40)	8,59 ± 6,49
	NOX4	AA	17,39% (4/23)	4,31 ± 1,59	21,62% (8/37)	9,81 ± 3,01	22,73% (5/22)	28,38 ± 14,86	22,5% (9/40)	10,60 ± 10,98
		GG	88,89% (24/27)	4,37 ± 1,08	89,74% (35/39)	9,60 ± 2,53	91,67% (22/24)	24,53 ± 9,29	92% (46/50)	9,44 ± 8,29
<i>rs12235235</i>		AG	11,11% (3/27)	4,75 ± 0,85	10,26% (4/39)	11,59 ± 3,00	8,33% (2/24)	19,19 ± 1,32	8 (4/50)	3,86 ± 0,95
		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
	RECK	GG	88,89% (24/27)	4,37 ± 1,08	89,74% (35/39)	9,60 ± 2,53	91,67% (22/24)	24,53 ± 9,29	92% (46/50)	9,44 ± 8,29
		AG	11,11% (3/27)	4,75 ± 0,85	10,26% (4/39)	11,59 ± 3,00	8,33% (2/24)	19,19 ± 1,32	8 (4/50)	3,86 ± 0,95
<i>rs1979277</i>		AA	-	-	-	-	-	-	-	-
		GG	37,04% (10/27)	4,05 ± 1,26	50% (21/42)	9,29 ± 2,45	36,84% (7/19)	25,71 ± 13,09	47,06% (24/51)	7,39 ± 5,88
	SHMT1	AG	48,15% (13/27)	4,57 ± 1,12	35,71% (15/42)	10,15 ± 2,79	47,37% (9/19)	19,98 ± 3,71	43,14% (22/51)	7,79 ± 5,90
		AA	14,81% (4/27)	4,84 ± 0,24	14,29% (6/42)	8,91 ± 2,46	15,79% (3/19)	25,72 ± 9,93	9,8% (5/51)	11,48 ± 14,92
<i>rs548987</i>	SLC17A3	GG	72,41% (21/29)	4,57 ± 1,05	74,42% (32/43)	9,86 ± 2,56	83,33% (20/24)	25,26 ± 9,42	82,69% (43/52)	8,32 ± 7,21

<i>rs1051266</i>		CG	27,59% (8/29)	3,90 ± 1,04	25,58% (11/43)	9,62 ± 2,86	16,67% (4/24)	18,19 ± 2,11	15,38% (8/52)	12,58 ± 11,36
		CC	-	-	-	-	-	-	1,92% (1/52)	2,22
	SLC19A1	GG	37,04% (10/27)	4,32 ± 1,31	26,83% (11/41)	10,18 ± 2,89	21,05% (4/21)	21,84 ± 4,83	23,53% (12/51)	9,34 ± 8,13
		AG	44,44% (12/27)	4,56 ± 0,99	56,10% (23/41)	9,67 ± 2,62	63,16% (12/21)	22,91 ± 10,62	43,14% (22/51)	7,22 ± 7,63
		AA	18,52% (5/27)	4,30 ± 1,16	17,07% (7/41)	8,53 ± 1,55	15,79% (3/21)	24,88 ± 9,08	33,33% (17/51)	7,95 ± 5,61
<i>rs13050920</i>	SLC19A1	GG	34,62% (9/26)	4,40 ± 1,13	50% (21/42)	9,8 ± 2,81	42,86% (8/19)	26,25 ± 12,63	50,98% (26/51)	8,95 ± 7,84
		AG	50% (13/26)	4,37 ± 1,12	38,10% (16/42)	8,98 ± 2,14	52,38% (10/19)	19,99 ± 4,51	41,18% (21/51)	5,87 ± 4,53
		AA	15,38% (4/26)	4,39 ± 1,42	11,90% (5/42)	8,82 ± 3,47	4,76% (1/19)	27,07	7,84% (4/51)	12,56 ± 10,64
<i>rs11950646</i>	SLC23A1	TT	39,29% (11/28)	4,47 ± 1,05	46,34% (19/41)	9,97 ± 2,78	54,55% (12/22)	26,76 ± 10,76	31,37% (16/51)	9,71 ± 9,66
		CT	46,43 (13/28)	4,35 ± 1,22	41,46% (17/41)	9,94 ± 2,58	40,91% (9/22)	22,81 ± 6,50	49,02% (25/51)	9,32 ± 7,84
		CC	14,29% (4/28)	3,58 ± 0,14	12,20% (5/41)	9,13 ± 2,60	4,55% (1/22)	15,21	19,61% (10/51)	7,02 ± 5,61
<i>rs33972313</i>	SLC23A1	GG	93,33% (28/30)	4,34 ± 1,06	97,73% (43/44)	9,82 ± 2,58	100% (24/24)	24,08 ± 9,01	96,15% (50/52)	8,83 ± 8,05
		AG	3,33% (1/30)	5,7	2,27% (1/44)	6,92	-	-	3,85% (2/52)	9,58 ± 8,91
		AA	3,33% (1/33)	3,4	-	-	-	-	-	-
<i>rs4257763</i>	SLC23A1	TT	37,04% (10/27)	4,62 ± 0,89	39,02% (16/41)	10,12 ± 2,85	56,52% (13/23)	26,13 ± 10,57	28,26% (13/46)	9,11 ± 9,08
		CT	48,15% (13/27)	4,28 ± 1,16	48,78% (20/41)	9,71 ± 2,50	39,13% (9/23)	22,81 ± 6,50	50% (23/46)	9,27 ± 8,08
		CC	14,81% (4/27)	3,58 ± 0,14	12,20% (5/41)	9,13 ± 2,60	4,35% (1/23)	15,21	21,74% (10/46)	7,02 ± 5,61
<i>rs6053005</i>	SLC23A1	CC	41,38% (12/29)	4,61 ± 1,05	21,43% (9/42)	8,99 ± 3,00	37,50% (9/24)	23,07 ± 6,81	38,46% (20/52)	9,75 ± 9,90
		CT	41,38% (19/29)	4,10 ± 0,97	47,62% (20/42)	10,19 ± 2,73	37,50% (9/24)	21,83 ± 6,63	42,31% (22/52)	8,52 ± 5,87
		TT	17,24% (4/28)	4,72 ± 1,07	30,52% (13/42)	9,64 ± 2,09	25% (6/24)	28,97 ± 13,74	19,23% (10/52)	7,84 ± 8,42
<i>rs6596473</i>	SLC23A1	GG	48,28% (14/29)	4,56 ± 1,07	46,51% (20/43)	9,82 ± 2,79	58,33% (14/24)	25,53 ± 10,39	36,54% (19/52)	8,94 ± 9,35
		CG	51,38% (12/29)	4,24 ± 1,20	44,19% (19/43)	9,86 ± 2,48	37,50% (9/24)	22,81 ± 6,50	48,08% (25/52)	9,82 ± 7,84
		CC	10,34% (3/29)	3,64 ± 0,08	9,30% (4/43)	8,78 ± 2,87	4,17% (1/24)	15,21	17,31% (9/52)	6,04 ± 4,95
<i>rs1776964</i>	SLC23A2	GG	20% (6/30)	4,71 ± 0,87	38,64% (17/44)	9,02 ± 2,06	25,0% (6/24)	24,16 ± 8,21	19,23% (10/52)	9,45 ± 10,02
		AG	56,67% (17/30)	4,18 ± 1,19	38,64% (17/44)	10,14 ± 2,87	50% (12/24)	21,85 ± 5,75	55,77% (29/52)	10,23 ± 8,33
		AA	23,33% (7/30)	4,46 ± 0,95	22,73% (10/44)	10,36 ± 2,85	25% (6/24)	28,47 ± 14,07	25% (13/52)	5,35 ± 3,94
<i>rs2681116</i>	SLC23A2	GG	39,29% (11/28)	4,73 ± 1,02	22,73% 910/44)	9,24 ± 2,93	34,78% (8/23)	23,90 ± 6,78	37,25% (19/51)	8,32 ± 7,76

rs6133175		AG	42,86% (12/28)	4,10 ± 0,97	47,73% (21/44)	10,08 ± 2,77	39,13% (9/23)	21,83 ± 6,63	41,18 (21/51)	7,90 ± 5,22
		AA	17,86% (5/28)	4,72 ± 1,07	29,55% (13/44)	9,64 ± 2,09	26,09% (6/23)	28,97 ± 13,74	21,57% (11/51)	9,08 ± 8,99
	SLC23A2	TT	26,67% (8/30)	4,54 ± 1,20	56,82% (25/44)	8,87 ± 2,25	50% (12/24)	22,33 ± 6,61	38,46% (20/52)	10,71 ± 10,28
rs6139591		CT	60% (18/30)	4,20 ± 1,09	31,82% (14/44)	10,47 ± 2,56	45,83% (11/24)	26,23 ± 11,36	36,54% (19/13)	8,72 ± 6,94
		CC	13,3% (4/30)	4,66 ± 0,77	11,36% (5/44)	12,24 ± 2,43	4,17% (1/24)	21,45	25% (13/52)	6,22 ± 4,24
	SLC23A2	CC	22,22% (6/27)	4,45 ± (1,16)	43,59% (17/39)	9,57 ± 2,05	33,33% (7/21)	27,10 ± 13,49	31,25% (15/48)	9,21 ± 8,19
		CT	51,85% (14/27)	4,35 ± (0,97)	43,59% (17/39)	10,48 ± 3,22	38,18% (8/21)	23,94 ± 7,24	45,83% (22/48)	8,05 ± 7,61
rs4880	SOD2	TT	25% (7/28)	4,62 ± 0,93	20,93% (9/43)	8,52 ± 2,00	33,33% (8/24)	21,44 ± 6,25	36% (18/50)	8,09 ± 5,33
		CT	60,71% (17/28)	4,29 ± 1,13	51,16% (22/43)	9,53 ± 2,69	37,50% (9/24)	25,63 ± 12,71	42% (21/50)	6,95 ± 6,39
		CC	14,29% (4/28)	3,81 ± 1,24	27,91% (12/43)	10,40 ± 2,55	29,16% (7/24)	25,10 ± 5,99	22% (11/50)	9,73 ± 10,14
rs11041321	SYT9	GG	86,67% (26/30)	4,42 ± 1,07	90,91% (40/44)	9,66 ± 2,64	79,19% (19/24)	23,31 ± 6,96	65,38% (34/52)	9,56 ± 8,97
		AG	13,33% (4/30)	3,90 ± 1,10	6,82% (3/44)	11,42 ± 1,91	20,83% (5/24)	27,01 ± 15,33	30,77% (16/52)	6,88 ± 5,67
		AA	-	-	2,27% (1/44)	8,65	-	-	3,85% (2/52)	12,88 ± 2,72
rs2713280	SYT9	TT	20% (6/30)	3,63 ± 0,94	23,26% (10/43)	9,17 ± 2,63	25% (6/24)	24,71 ± 6,68	21,15% (11/52)	4,88 ± 3,53
		CT	46,67% (14/30)	4,48 ± 1,12	46,51% (20/43)	9,09 ± 2,39	41,67% (10/24)	21,95 ± 6,02	50% (26/52)	11,39 ± 10,14
		CC	33,33% (10/30)	4,61 ± 0,97	30,23% (13/30)	11,42 ± 2,28	33,33% (8/24)	26,28 ± 13,26	28,85% (15/52)	7,40 ± 3,61
rs34324219	TCN1	GG	76,67% (23/30)	4,37 ± 1,16	86,36% (38/44)	9,84 ± 2,66	87,50% (21/24)	24,33 ± 9,53	80,77% (42/52)	9,20 ± 8,43
		TG	23,33% (7/30)	4,30 ± 0,74	13,64% (6/44)	9,25 ± 2,17	12,50% (3/24)	22,34 ± 4,36	19,23% (10/52)	7,45 ± 5,91
		TT	-	-	-	-	-	-	-	-
rs34528912	TCN1	CC	96,55% (28/29)	4,36 ± 1,02	93,18% (41/44)	9,70 ± 2,58	83,33% (20/24)	24,68 ± 9,78	90,20% (46/51)	8,45 ± 7,34
		CT	3,45% (1/29)	2,74	6,82% (3/44)	10,60 ± 3,16	16,67% (4/24)	21,10 ± 1,35	9,80% (5/51)	11,96 ± 13,81
		TT	-	-	-	-	-	-	-	-
rs526934	TCN1	AA	55,17% (16/29)	4,19 ± 1,28	63,64% (28/44)	9,97 ± 2,67	66,67% (16/24)	23,38 ± 7,19	61,54% (32/52)	9,91 ± 8,91
		AG	37,93% (11/29)	4,73 ± 0,56	34,09% (15/44)	9,43 ± 2,57	33,33% (8/24)	25,48 ± 12,35	36,54% (19/52)	7,26 ± 6,21
		GG	6,90% (2/29)	4,07 ± 1,46	2,27% (1/44)	8,8	-	-	1,92% (1/52)	5,5
rs1131603	TCN2	TT	86,67% (26/30)	4,37 ± 1,07	90,91% (40/44)	9,71 ± 2,67	95,83% (23/24)	24,43 ± 9,04	88,46%(46/52)	8,36 ± 7,20

rs1801198		CT	13,33% (4/30)	4,20 ± 1,21	9,09% (4/44)	10,21 ± 1,73	4,17% (1/24)	15,98	11,54%(6/46)	12,70 ± 12,81
		CC	-	-	-	-	-	-	-	-
	TCN2	GG	40% (10/25)	4,34 ± 1,33	28,21% (11/39)	10,14 ± 2,53	41,18% (7/17)	25,45 ± 13,68	28,26% (13/46)	6,67 ± 4,56
		CG	52% (13/25)	4,58 ± 0,96	56,41% (22/39)	9,22 ± 2,40	52,94% (9/17)	22,20 ± 5,59	54,35% (25/46)	9,37 ± 8,78
CC		8% (2/25)	4,0 ± 1,25	15,38% (6/39)	9,90 ± 3,22	5,88% (1/17)	24,17	17,39% (8/46)	7,53 ± 6,01	
rs731991	TCN2	GG	36,67% (11/30)	4,10 ± 1,34	13,64% (6/44)	10,90 ± 3,15	33,33% (8/24)	26,72 ± 12,36	25% (13/52)	6,97 ± 4,44
		AG	50,0% (15/30)	4,42 ± 0,82	70,45% (31/44)	9,41 ± 2,35	54,17% (13/24)	21,92 ± 6,58	51,92% (27/52)	10,94 ± 9,75
		AA	13,33% (4/40)	4,79 ± 1,19	15,91% (7/44)	10,32 ± 3,14	12,50% (3/24)	26,43 ± 8,47	23,08% (12/52)	6,23 ± 5,20
rs757874	TCN2	CC	46,67% (14/30)	4,54 ± 1,05	54,55% (24/44)	10,10 ± 2,67	50% (12/24)	21,93 ± 6,67	71,15% (37/52)	9,59 ± 9,01
		AC	43,33% (13/30)	4,28 ± 0,95	43,18% (19/44)	9,12 ± 2,35	37,50% (9/24)	27,99 ± 11,99	25% (13/52)	7,27 ± 4,53
		AA	10% (3/30)	3,77 ± 1,78	2,27% (1/44)	13,76	12,50 (3/24)	20,97 ± 5,54	3,85% (2/52)	5,66
rs596909	TYMS	CC	100% (30/30)	4,35 ± 1,07	100% (43/43)	9,82 ± 2,58	100% (24/24)	24,08 ± 9,01	100% (52/52)	8,86 ± 7,99
			-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-

Chapitre 3. Discussion

1. Relation des niveaux plasmatiques en homocystéine sur les symptômes des patients EM

Dans le cadre de notre étude, les premiers résultats biochimiques obtenus sont le dosage de l'homocystéine circulant. Au sein de notre cohorte, 22,2% des patients EM (25/112) présentaient une hyperhomocystéinémie par rapport à 15,5% chez le groupe témoin apparié (9/58). Une hypohomocystéinémie concernait plus 32.1% des PAEM (36/112). En ce qui concerne la population témoin, 50% des individus présentait une hypohomocystéinémie (29/58) d'origine inconnue. Retenons qu'il s'agit d'une population vieillissante, de ce fait, certains traitements peuvent en être la cause.

Afin de déterminer si les niveaux pathologiques en homocystéine avaient une influence sur la santé et la qualité de vie des patients EM, nous avons utilisé trois questionnaires : le DSQ, le SF-36 et le MFI. Pour le SF-36, le score physique et le score mental des patients EM étaient significativement plus faibles que ceux des témoins ($p=1.88^{-35}$ et $p=2.29^{-23}$ respectivement). En comparant les sous-groupes de patients stratifiés en fonction de l'homocystéine, le score physique des patients EM (hommes et femmes confondus) avec une hyperhomocystéinémie présentait une diminution quasi significative en comparaison avec celui des patients EM ayant un niveau d'homocystéine normal ($p=0,057$).

Le MFI-20 permet d'obtenir différents scores: un score pour la fatigue générale, un pour la fatigue physique, un autre pour la fatigue mentale, un score d'activité réduite et de motivation réduite. Tous les patients EM ont des scores significativement plus élevés que les sujets sains. Les hommes atteints d'EM présentant une hyperhomocystéinémie avaient une réduction significative de la motivation par rapport aux groupes d'hommes malades présentant une hypohomocystéinémie ($p=0.035$).

L'analyse du questionnaire DSQ montre également une différence significativement entre les témoins et les patients. Le score du malaise après l'effort (obtenu à partir du DSQ), est statistiquement plus élevés chez les sujets (hommes et femmes confondus) ayant une

hyperhomocystéinémie en comparaison avec les malades qui ont des taux normaux en homocystéine ($p=0,032$). Le score attribué aux troubles du sommeil est statistiquement plus élevé chez : i) les hommes avec une hyperhomocystéinémie par rapport au groupe d'hommes malades ayant un niveau normal en Hcy ($p=0,04$), ii) les hommes EM avec une hypohomocystéinémie comparés à ceux qui sont malades et présentant une valeur en Hcy dite normale ($p=0,017$).

L'analyse des différents questionnaires a montré que l'élévation ou la diminution des niveaux plasmatiques en Hcy pouvait être associée à une sévérité des symptômes ce qui rejoint notre hypothèse. En outre, ce ne sont pas les mêmes manifestations cliniques qui sont soulignées chez ses deux sous-populations de patients ce qui confirme la pertinence clinique de doser l'Hcy chez les patients EM.

Nous avons analysé les comorbidités présentes chez les patients atteints d'EM et les sujets sains de notre cohorte québécoise, parmi lesquelles figurent la dépression, l'anxiété, la fibromyalgie, les troubles inflammatoire de l'intestin. Nous avons examiné, pour chacune des comorbidités indiquées par les patients EM, s'il y avait une relation avec les niveaux plasmatiques en homocystéine. Des patients EM qui souffrent également de troubles inflammatoires de l'intestin présentaient une forte élévation de l'homocystéine. En effet, il a été mis en évidence que la dépression, l'anxiété, les troubles neurocognitifs mais aussi les désordres inflammatoires de l'intestin sont associés à l'hyperhomocystéinémie (105-107). Toutefois, les scores moyens attribués aux problèmes cognitifs, aux manifestations neuroendocriniennes, immunitaires et du système nerveux autonome (à partir du DSQ) pour les patients EM présentant une élévation des niveaux d'Hcy, étaient non significativement plus élevés comparés à ceux des autres malades et des témoins, de même que ceux qui correspondent à la fatigue physique (MFI) et le score physique évaluée dans le questionnaire SF-36.

Les cas ayant une hypohomocystéinémie ont un score mental (SF-36) moyen plus faible, néanmoins ce dernier est non significatif par rapport aux autres sujets malades. En outre, le score moyen attribué à la population témoin s'élève à 86.8 ± 9.8 comparés à celui de tous les patients EM (femmes et hommes) qui est de 42.9 ± 18.8 avec une différence significative ($P < 0.05$). Sur le plan clinique, un grand nombre de patients EM présentant

une hypohomocystéinémie évoquait des troubles de santé mentale et des maladies neurodégénératives notamment le syndrome maniaco-dépressif, comportement suicidaire (un individu), la maladie de Parkinson. D'ailleurs, une carence en Hcy peut limiter la synthèse de certains produits tels que la cystéine et le glutathion. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une diminution des taux en glutathion pourrait contribuer au développement des troubles neuro-développementaux et neuropsychiatriques, notamment la schizophrénie (168).

Bien que non significatifs, les différents scores moyens retrouvés chez les deux groupes de patients EM ayant une hyper et une hypohomocystéinémie soulignent l'importance de tenir compte de l'impact des niveaux plasmatiques en homocystéine sur les symptômes des malades.

En ce qui concerne l'association de l'homocystéine et l'encéphalomyélite myalgique, nos résultats ont permis d'établir une stratification des patients sur la base des niveaux d'homocystéine, ainsi qu'une corrélation entre l'exacerbation de certains symptômes cardinaux. Ceci est intéressant car de nouvelles pistes de recherche peuvent être investiguées.

2. Recherche des causes pouvant expliquer les changements anormaux des niveaux circulants de l'homocystéine

Par la suite, nous avons examiné en premier lieu les cofacteurs possibles au niveau nutritionnel pour comprendre l'origine de ses concentrations plasmatiques anormales en homocystéine. Plus précisément, nous avons dosé les cofacteurs nutritionnels (vitamines B6, B12, C et folate) au niveau plasmatique et urinaire. En effet, une carence en vitamines B6, B12 et/ou folate peut être la conséquence d'un défaut d'apport ou encore une malabsorption héréditaire, ce qui pourrait induire une hyperhomocystéinémie (169).

La vitamine C, ou acide ascorbique correspond à une des vitamines antioxydants, ayant la capacité de limiter l'oxydation des molécules réduites (170). Elle ne joue aucun rôle dans le métabolisme de l'homocystéine, cependant le stress oxydatif ou encore les troubles

cognitifs sont l'une des conséquences de l'hyperhomocystéinémie. De nombreuses études ont démontré que l'apport d'antioxydants, notamment les vitamines C et E, avec ou sans les vitamines du groupe B augmentait la capacité antioxydante, de ce fait, diminuait les dommages oxydatifs (171, 172). En effet, des niveaux accrus d'homocystéine peuvent contribuer à la libération d'espèces réactives de l'oxygène. Les résultats des travaux de Ullegaddi R, et *al.*, laissent sous-entendre une corrélation entre les antioxydants et les manifestations engendrées par l'Hcy, qui a un effet pro-oxydatif.

L'hyperhomocystéinémie chez les patients EM n'est pas due à une carence nutritionnelle contrairement aux témoins présentant une élévation des niveaux en homocystéine. Chez tous les patients EM étudiés, les valeurs des vitamines B6, B12, C et folate au niveau plasmatique étaient dans l'intervalle des valeurs usuelles. Les valeurs plasmatiques moyennes du folate chez les patients EM ayant une hyperhomocystéinémie et celles de la vitamine B12 chez les cas présentant une hypohomocystéinémie étaient légèrement plus élevées comparées aux concentrations des mêmes vitamines correspondantes chez les autres sous-groupes, bien qu'aucune différence significative n'ait été démontrée.

Dans des conditions physiologiques, l'excrétion quotidienne des vitamines B6, B12 et folate, qui sont des modulateurs importants des taux plasmatiques d'Hcy, est minime que ce soit par voie fécale ou dans les urines. Le dosage des vitamines dans les échantillons d'urine des participants permettait d'évaluer l'absorption digestive.

Au niveau urinaire, les taux en vitamines B6, B12, C et folate normalisés présentent des valeurs homogènes chez les patients EM et les individus sains, ce qui indique qu'ils n'en excrèteraient pas plus.

Chez les sujets sains ayant une hyperhomocystéinémie, nous observons des plus faibles concentrations en acide folique (vitamine B9) et en vitamine B12 au niveau urinaire comparées aux sous-groupes témoins et patients EM stratifiés. La comparaison des résultats indiquerait une carence nutritionnelle chez les sujets sains présentant une hyperhomocystéinémie. À partir de cette constatation, nous avons été voir au niveau génétique chez l'ensemble de notre cohorte (PAEM et témoins) afin de tenter d'expliquer l'hypo et l'hyperhomocystéinémie.

3. Investigation au niveau génétique

Après une exploration biochimique, nous nous sommes orientés vers la génétique afin d'identifier les causes possibles des changements observés au niveau des concentrations plasmatiques en Hcy étant donné que l'hyperhomocystéinémie des patients EM ne semble pas être due à des carences nutritionnelles. Nous avons donc sélectionné 110 variants connus pouvant moduler la voie métabolique de l'homocystéine, y compris des polymorphismes dans des gènes de transporteurs des vitamines d'intérêt. Le génotypage a été effectué au centre d'innovation Génome Québec.

Lors d'une première analyse d'association statistique, nous avons comparé les données du génotypage de tous les patients EM par rapport aux témoins de notre cohorte. Le SNP rs7703033 identifié dans le gène MTRR a présenté une forte association avec les patients EM (*p value non adjusted* = 0.00012) même après la correction de Bonferroni ($p=0.007$). La correction de Bonferroni correspond à une méthode statistique utilisée pour corriger le seuil de significativité dans les tests multiples.

Par la suite, nos résultats d'analyse statistique ont identifié des SNPs spécifiquement associés aux sous-groupes de patients EM stratifiés selon le niveau d'Hcy.

Chez les patients EM présentant une hyperhomocystéinémie, nos résultats ont indiqué des associations entre les polymorphismes suivants : rs2124459 (CBS), rs17367504 (MTHFR), rs4257763 (SLC23A1) et rs1195646 (SLC23A2).

Le SNP intronique rs2124459 identifié dans le gène cystathionine- β -synthase (CBS) semble être associé au phénotype de l'hyperhomocystéinémie chez les patients EM avec une *p value non adjusted* < 0.05. Deux études ont indiqué que ce variant génétique (rs2124459) avait une association avec des concentrations sériques en vitamine B12 et en folate, cependant les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement caractérisés (99, 173). Dans notre étude, rs2124459 avait une *p value* significative avant la correction de Bonferroni ($p=0.04$) suggérant une association potentielle avec l'hyperhomocystéinémie chez les patients EM.

Le SNP intronique, rs17367504, est localisé dans le gène méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) mais cette région comporte également d'autres gènes (174). Comme nous le savons, l'enzyme MTHFR joue un rôle crucial dans le cycle du folate et le métabolisme de l'homocystéine (Figure 4). La réaction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyltétrahydrofolate est catalysée par la MTHFR. Fedorowski A, et al., ont indiqué que le variant rs17367504 (MTHFR) était associé à l'hypotension orthostatique, l'une des comorbidités de l'EM (175). De plus, les travaux de Thomsen LC, et al., ont suggéré que ce variant génétique était significativement associé à la pré-éclampsie, maladie touchant certaines femmes durant la grossesse qui se caractérise par une hypertension artérielle. L'allèle mineur (G) de ce SNP a montré un effet protecteur face au développement de la pathologie (176). Le rs17367504 a indiqué une association potentiellement significative avec l'élévation de l'Hcy présente chez le groupe de sujets malades (*p value non adjusted* < 0.05).

Parmi les quatre SNPs plus fortement associés à l'hyperhomocystéinémie chez les patients EM, deux variants sont localisés dans des gènes de transport de la vitamine C. En effet, les deux variants rs4257763 et rs1195046 localisés dans les gènes SLC23A1 et SLC23A2 respectivement, qui codent pour des transporteurs de la vitamine C, notamment SVCT1 (*SLC23A1*) et SVCT2 (*SLC23A2*) (Sodium-dependent vitamin C 1 / 2) ont une forte association avec les patients EM présentant une hyperhomocystéinémie avec des *p values non adjusted* < 0.05. De plus, en comparant les concentrations plasmatiques de la vitamine C de nos patients EM, les génotypes CT (des SNPs rs4257763 et rs1195046) sont associés à des niveaux moyens plus faibles en vitamine C dans tous les sous-groupes de sujets EM indépendamment de la stratification de l'Hcy.

En effet, nous avons observé des différences dans les concentrations plasmatiques moyennes de la vitamine C chez les patients EM et les sujets sains selon la stratification établie à partir des niveaux d'homocystéine, le sexe des individus par rapport aux différents génotypes (TT, CT et CC). Toutefois, la teneur en vitamine C plasmatique varie principalement selon l'ingestion récente de chaque individu, même si des variants génétiques peuvent affecter cette concentration. Les patients EM hommes qui présentent une hyperhomocystéinémie ont une concentration plasmatique moyenne en vitamine C

plus faible comparée à celle des autres sous-groupes de patients EM. En effet, cette variation de l'acide ascorbique plasmatique est beaucoup plus prononcée chez les patients atteints d'EM qui présentent une HHcy : TT = 17 ± 12 ng/ml, CT = 10 ± 4 ng/ml, CC = 13 ng/ml pour le SNP de SLC23A1 et TT = 16 ± 11 ng/ml, CT = 9 ± 10 ng/ml, CC = 13 ng/ml pour le SNP de SLC23A2. Ces différences ne sont néanmoins pas statistiquement significatives

Nous avons observé que les SNPs mentionnés ci-dessus étaient potentiellement spécifiques à la sous-population de patients EM présentant une élévation de l'homocystéine et ne l'étaient pas dans l'autre sous-groupe EM avec une hypohomocystéinémie ni les sujets témoins.

Concernant les variants génétiques présentant une forte association avec l'hypohomocystéinémie des patients EM, nous avons identifié les deux variants suivants : le rs7703033 (MTRR) et le rs1801198 (TCN2).

Le SNP rs7703033 est localisé dans une région intronique du gène de la méthionine synthase réductase (MTRR). Cette enzyme catalyse la méthylation de la cobalamine en méthylcobalamine, qui est le cofacteur de la méthionine synthase (MTR). Tanaka T, et al., ont indiqué une association entre le SNP rs7703033 et l'homocystéine. Toutefois, compte tenu de la très forte association de ce polymorphisme indépendamment de la concentration en Hcy chez les patients EM, il est plus plausible que ce dernier soit plutôt un marqueur génétique associé à la maladie que l'hypohomocystéinémie chez un sous-groupe de patients EM (*p value non adjusted* = 0.004).

Par ailleurs, seul le polymorphisme rs1801198 présent dans le gène transcobalamine II (TCN2) passe la correction de Bonferroni et atteint la significativité dans les différents tests statistiques effectués. D'un point de vue de la fonctionnalité, une méta-analyse a indiqué que ce variant a une influence sur la transcription de TCN2 mais également la concentration de l'holotranscobalamine (vitamine B12 liée à la transcobalamine II) lorsque les sujets avaient le génotype GG contrairement aux homozygotes CC. De plus des niveaux élevés en Hcy ont été décelés seulement chez des individus européens présentant le génotype GG, tandis que dans les autres cohortes analysées, les concentrations en Hcy étaient normales (177). Chez les patients EM présentant une hypohomocystéinémie dans notre cohorte, la

vitamine B12 est plus élevée dans les échantillons de plasma de cette population comparée au groupe de témoins sains et patients EM ayant un niveau d'Hcy normal et ceux présentant une hyperhomocystéinémie. En regardant, les valeurs de la vitamine B12 urinaires, les individus EM avec une hypohomocystéinémie ne semblent pas avoir des défauts d'excrétion. Les résultats plasmatiques chez ce sous-groupe de patients pourraient être expliqués par une diminution de l'activité de TCN2. Toutefois, il y a une contradiction car cette réduction fonctionnelle n'est pas observée chez les patients EM présentant une hyperhomocystéinémie. De plus, le fait d'avoir une très faible concentration en homocystéine, cela ne peut s'expliquer pas par la présence du SNP rs1801198. Dans le plasma, la vitamine B12 est transportée par la transcobalamine II aux différentes cellules de l'organisme (178). Retenons que lors du dosage sérique, il s'agit de la vitamine B12 liée à la transcobalamine II (forme active, 20 – 25%) et la forme liée à l'haptocorrine (appelé complexe holohaptocorrine, forme majoritaire) qui sont mesurées, de ce fait des concentrations sériques dites « normales » peuvent masquer une carence (177). Cependant, seule la fraction associée à la transcobalamine II (complexe holotranscobalamine) est biodisponible (177).

Contrairement à d'autres études d'association génomiques à l'échelle du génome et des analyses de gènes candidats portées sur la relation de l'hyperhomocystéinémie et différentes pathologies, nous n'avons pas trouvé de corrélation avec les variants communs de MTHFR, notamment rs1801131 et rs1801133, qui sont les plus étudiés. Dans les différentes cohortes, il a été indiqué que rs1801133 est fortement associé à un faible statut en folate et une hyperhomocystéinémie car il engendrerait une enzyme thermolabile dont l'activité est diminuée. En revanche, aucune étude n'a examiné les facteurs génétiques chez des sujets ayant des faibles concentrations en homocystéine, or chez ce sous-groupe de patients EM, l'hypohomocystéinémie semble avoir une influence sur l'exacerbation de certains symptômes.

Bien que les mécanismes par lesquels ces polymorphismes influencent les niveaux de l'homocystéine peuvent être uniques à chacun d'eux, l'hyper et l'hypohomocystéinémie peuvent s'expliquer en partie par l'association synergique de plusieurs SNPs. Notre étude présente des limites. Tout d'abord, nous avons regardé les

polymorphismes les plus connus dans la littérature. Nous n'avons pas examiné les variants les plus rares qui pourraient contribuer à une hyper et/ou une hypohomocystéinémie chez les patients EM québécois. Deuxièmement, dans notre approche génétique, nous avons utilisé les données de CARTaGENE afin d'augmenter notre cohorte de témoins et la puissance statistique. Toutefois, le dosage de l'homocystéine et des autres marqueurs n'a pas été effectué sur ses échantillons et représente une limitation à la présente étude. De plus nous n'avons pas le profil complet sur le plan biochimique et concernant les questionnaires des participants de CARTaGENE même si ceux-ci sont exempts de maladies (incluant la fibromyalgie).

Au terme de ce volet génétique, nous avons pu démontrer que des variants génétiques communs indiquent une association potentielle entre l'hyper et l'hypohomocystéinémie chez les sous-groupes de patients EM car, suite à l'analyse statistique, certains polymorphismes inédits étaient observables dans ses deux sous-populations. Cependant, l'ensemble de ses données préliminaires nous dirigent vers des analyses et une évaluation génétique plus poussées afin d'identifier des marqueurs génétiques (variants rares et/ou polymorphismes) pouvant caractériser les modulations de l'homocystéine chez ses sous-groupes de patients EM.

Chapitre 4. Perspective

La suite de cette étude, consistera à identifier les variants génétiques rares possiblement impliqués dans le métabolisme de l'homocystéine dans le contexte de l'EM en effectuant un séquençage d'exomes. Cette recherche s'effectuera, particulièrement sur des patients EM présentant une hyperhomocystéinémie et une hypohomocystéinémie. Il serait souhaitable d'inclure également des patients EM ayant un niveau d'Hcy normal. De ce fait, l'analyse des données permettra d'identifier des variants spécifiquement associés aux niveaux anormaux de l'Hcy dans un premier temps, mais aussi des anomalies génétiques inédites plus spécifiquement associée à la pathologie.

En nous basant sur nos découvertes précédentes, nous émettons l'hypothèse suivante que l'hyperhomocystéinémie et l'hypohomocystéinémie des patients EM sont dues à une prédisposition génétique et possiblement aussi suite à des changements épigénétiques aggravant leur état de santé.

Par la suite, il sera nécessaire de développer des approches thérapeutiques adaptées prenant en compte la caractérisation des niveaux d'Hcy des patients EM. Plus précisément, ce travail permettra de déterminer si les traitements pour abaisser les niveaux d'homocystéine améliorent l'état de santé des patients présentant une hyperhomocystéinémie et inversement pour ceux qui ont une hypohomocystéinémie. L'évaluation de l'effet d'un traitement reposera donc sur : 1. les concentrations anormales en homocystéine mais aussi 2. L'état de santé général des patients en tenant compte de chacun des symptômes. Il faut aussi rappeler que ses patients ne présentent pas de carence nutritionnelle, et donc la prise de supplément en vitamines B6, B12 et/ou folate ne sera pas efficace. Toutefois, afin de délivrer un traitement, il faut établir la dose, le suivi et la durée de ce dernier.

La caractérisation des mécanismes associés à l'EM est indispensable au développement d'une médecine personnalisée et d'un diagnostic objectif à l'aide de biomarqueurs validés. Dans cet article, nous avons montré des corrélations entre le taux de l'homocystéine et l'exacerbation des symptômes associés à l'encéphalomyélite myalgique. Dans ce contexte, la caractérisation des cibles cellulaires et le rôle de l'homocystéine dans l'aggravation de

la maladie permettra une meilleure intervention en ciblant plus spécifiquement certains sous-groupes de PAEM. Des études futures sont envisagées afin d'améliorer notre compréhension sur l'homocystéine et l'EM.

Chapitre 5. Conclusion

À l'heure actuelle, l'encéphalomyélite myalgique reste, dans sa globalité, la dernière énigme médicale du 21^e siècle.

Suite à une recherche de biomarqueurs, nous avons caractérisé une hyper et une hypohomocystéinémie chez des groupes de patients EM. Globalement, l'hyperhomocystéinémie est reconnue pour être un facteur de risque indépendant. Cependant, les conséquences d'une faible teneur en homocystéine sont sous-estimées. Nous avons évalué et démontré pour la première fois l'impact des niveaux plasmatiques en d'Hcy sur les manifestations cliniques des patients atteints d'EM. Les analyses réalisées ont montré que les patients EM avec une hyperhomocystéinémie mais aussi ceux avec une hypohomocystéinémie étaient plus gravement atteints, au niveau de symptômes cardinaux distincts.

L'ensemble de nos travaux montre que ces valeurs pathologiques en homocystéine chez certains patients EM qui ne sont pas engendrées par des carences nutritionnelles mais plutôt par une prédisposition génétique et/ou des facteurs épigénétiques. En revanche, les données biochimiques des individus sains présentant une hyperhomocystéinémie semblent indiquer une carence vitaminique. Nous distinguons donc trois sous-groupes selon le niveau d'homocystéine. Nonobstant que l'Hcy est un facteur de risque indépendant dans le contexte de l'EM, la découverte d'un premier polymorphisme spécifiquement associé à l'EM (rs7703033) dans le gène MTRR, ouvre une nouvelle porte quant au rôle de ce gène dans la pathogenèse de l'EM. Finalement, quant aux autres variants plus spécifiquement associés au niveaux d'Hcy chez les sous-groupes de patients EM, ceux-ci doivent être davantage investigués pour en comprendre leurs effets au niveau génétique et épigénétique.

Chapitre 6. Références

1. de Vega WC, Herrera S, Vernon SD, McGowan PO. Epigenetic modifications and glucocorticoid sensitivity in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):11.
2. Fenouillet E, Vigouroux A, Steinberg JG, Chagvardieff A, Retornaz F, Guieu R, et al. Association of biomarkers with health-related quality of life and history of stressors in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome patients. *J Transl Med*. 2016;14:251.
3. Petty RD, McCarthy NE, Le Dieu R, Kerr JR. MicroRNAs hsa-miR-99b, hsa-miR-330, hsa-miR-126 and hsa-miR-30c: Potential Diagnostic Biomarkers in Natural Killer (NK) Cells of Patients with Chronic Fatigue Syndrome (CFS)/ Myalgic Encephalomyelitis (ME). *PLoS One*. 2016;11(3):e0150904.
4. Light AR, White AT, Huguen RW, Light KC. Moderate exercise increases expression for sensory, adrenergic, and immune genes in chronic fatigue syndrome patients but not in normal subjects. *J Pain*. 2009;10(10):1099-112.
5. Rusu C, Gee ME, Lagace C, Parlor M. Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia in Canada: prevalence and associations with six health status indicators. *Health Promot Chronic Dis Prev Can*. 2015;35(1):3-11.
6. Afari N, Buchwald D. Chronic fatigue syndrome: a review. *Am J Psychiatry*. 2003;160(2):221-36.
7. Vincent A, Brimmer DJ, Whipple MO, Jones JF, Boneva R, Lahr BD, et al. Prevalence, incidence, and classification of chronic fatigue syndrome in Olmsted County, Minnesota, as estimated using the Rochester Epidemiology Project. *Mayo Clin Proc*. 2012;87(12):1145-52.
8. Johnston S, Brenu EW, Staines D, Marshall-Gradisnik S. The prevalence of chronic fatigue syndrome/ myalgic encephalomyelitis: a meta-analysis. *Clin Epidemiol*. 2013;5:105-10.
9. Maclachlan L, Watson S, Gallagher P, Finkelmeyer A, Jason LA, Sunnquist M, et al. Are current chronic fatigue syndrome criteria diagnosing different disease phenotypes? *PLoS One*. 2017;12(10):e0186885.
10. Collin SM, Nuevo R, van de Putte EM, Nijhof SL, Crawley E. Chronic fatigue syndrome (CFS) or myalgic encephalomyelitis (ME) is different in children compared to in adults: a study of UK and Dutch clinical cohorts. *BMJ Open*. 2015;5(10):e008830.
11. Rowe PC, Underhill RA, Friedman KJ, Gurwitt A, Medow MS, Schwartz MS, et al. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome Diagnosis and Management in Young People: A Primer. *Front Pediatr*. 2017;5:121.

12. Ingman T, Ali S, Bhui K, Chalder T. Chronic fatigue syndrome: comparing outcomes in White British and Black and minority ethnic patients after cognitive-behavioural therapy. *Br J Psychiatry*. 2016;209(3):251-6.
13. Aaron LA, Burke MM, Buchwald D. Overlapping conditions among patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and temporomandibular disorder. *Arch Intern Med*. 2000;160(2):221-7.
14. Lichtenstein A, Tiosano S, Amital H. The complexities of fibromyalgia and its comorbidities. *Curr Opin Rheumatol*. 2017.
15. Atzeni F, Cazzola M, Benucci M, Di Franco M, Salaffi F, Sarzi-Puttini P. Chronic widespread pain in the spectrum of rheumatological diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25(2):165-71.
16. Meeus M, Nijs J, Meirleir KD. Chronic musculoskeletal pain in patients with the chronic fatigue syndrome: a systematic review. *Eur J Pain*. 2007;11(4):377-86.
17. Collin SM, Nijs J, Meeus M, Polli A, Willekens B, Ickmans K. Endogenous Pain Facilitation Rather Than Inhibition Differs Between People with Chronic Fatigue Syndrome, Multiple Sclerosis, and Controls: An Observational Study. *Pain Physician*. 2017;20(4):E489-E97.
18. Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM, Komaroff AL, Schonberger LB, Straus SE, et al. Chronic fatigue syndrome: a working case definition. *Ann Intern Med*. 1988;108(3):387-9.
19. Twisk FN. Replacing Myalgic Encephalomyelitis and Chronic Fatigue Syndrome with Systemic Exercise Intolerance Disease Is Not the Way forward. *Diagnostics (Basel)*. 2016;6(1).
20. Jason LA, McManimen S, Sunnquist M, Brown A, Furst J, Newton JL, et al. Case definitions integrating empiric and consensus perspectives. *Fatigue*. 2016;4(1):1-23.
21. Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. *Ann Intern Med*. 1994;121(12):953-9.
22. Carruthers BM. Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Clinical Working Case Definition, Diagnostic and Treatment Protocols. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*. 2003.
23. Sharpe MC, Archard LC, Banatvala JE, Borysiewicz LK, Clare AW, David A, et al. A report--chronic fatigue syndrome: guidelines for research. *J R Soc Med*. 1991;84(2):118-21.
24. Brurberg KG, Fonhus MS, Larun L, Flottorp S, Malterud K. Case definitions for chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis (CFS/ME): a systematic review. *BMJ Open*. 2014;4(2):e003973.

25. Carruthers BM, van de Sande MI, De Meirleir KL, Klimas NG, Broderick G, Mitchell T, et al. Myalgic encephalomyelitis: International Consensus Criteria. *J Intern Med*. 2011;270(4):327-38.
26. Loy BD, O'Connor PJ, Dishman RK. Effect of Acute Exercise on Fatigue in People with ME/CFS/SEID: A Meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*. 2016;48(10):2003-12.
27. Jason LA, Zinn ML, Zinn MA. Myalgic Encephalomyelitis: Symptoms and Biomarkers. *Curr Neuroparmacol*. 2015;13(5):701-34.
28. Jason LA, Sunnquist M, Brown A, Reed J. Defining Essential Features of Myalgic Encephalomyelitis and Chronic Fatigue Syndrome. *J Hum Behav Soc Environ*. 2015;25(6):657-74.
29. Jason LA, Brown A, Clyne E, Bartgis L, Evans M, Brown M. Contrasting case definitions for chronic fatigue syndrome, Myalgic Encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and myalgic encephalomyelitis. *Eval Health Prof*. 2012;35(3):280-304.
30. Ffrench G. The Clinical Significance of Tiredness. *Can Med Assoc J*. 1960;82(13):665-71.
31. Berger AM, Mooney K, Alvarez-Perez A, Breitbart WS, Carpenter KM, Cella D, et al. Cancer-Related Fatigue, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015;13(8):1012-39.
32. Gay CW, Robinson ME, Lai S, O'Shea A, Craggs JG, Price DD, et al. Abnormal Resting-State Functional Connectivity in Patients with Chronic Fatigue Syndrome: Results of Seed and Data-Driven Analyses. *Brain Connect*. 2016;6(1):48-56.
33. Cook DB, Stegner AJ, Nagelkirk PR, Meyer JD, Togo F, Natelson BH. Responses to exercise differ for chronic fatigue syndrome patients with fibromyalgia. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(6):1186-93.
34. Staud R. Abnormal endogenous pain modulation is a shared characteristic of many chronic pain conditions. *Expert Rev Neurother*. 2012;12(5):577-85.
35. Reeves WC, Lloyd A, Vernon SD, Klimas N, Jason LA, Bleijenberg G, et al. Identification of ambiguities in the 1994 chronic fatigue syndrome research case definition and recommendations for resolution. *BMC Health Serv Res*. 2003;3(1):25.
36. Terman M, Levine SM, Terman JS, Doherty S. Chronic fatigue syndrome and seasonal affective disorder: comorbidity, diagnostic overlap, and implications for treatment. *Am J Med*. 1998;105(3A):115S-24S.
37. Light AR, Vierck CJ, Light KC. Myalgia and Fatigue: Translation from Mouse Sensory Neurons to Fibromyalgia and Chronic Fatigue Syndromes
Translational Pain Research: From Mouse to Man. Kruger L, Light AR, editors. Boca Raton, FL: Llc.; 2010.

38. Pedersen M, Ekstedt M, Smastuen MC, Wyller VB, Sulheim D, Fagermoen E, et al. Sleep-wake rhythm disturbances and perceived sleep in adolescent chronic fatigue syndrome. *J Sleep Res.* 2017;26(5):595-601.
39. Russell C, Wearden AJ, Fairclough G, Emsley RA, Kyle SD. Subjective but Not Actigraphy-Defined Sleep Predicts Next-Day Fatigue in Chronic Fatigue Syndrome: A Prospective Daily Diary Study. *Sleep.* 2016;39(4):937-44.
40. Roizenblatt S, Souza AL, Palombini L, Godoy LM, Tufik S, Bittencourt LR. Musculoskeletal Pain as a Marker of Health Quality. Findings from the Epidemiological Sleep Study among the Adult Population of Sao Paulo City. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142726.
41. Pejovic S, Natelson BH, Basta M, Fernandez-Mendoza J, Mahr F, Vgontzas AN. Chronic fatigue syndrome and fibromyalgia in diagnosed sleep disorders: a further test of the 'unitary' hypothesis. *BMC Neurol.* 2015;15:53.
42. Snodgrass K, Harvey A, Scheinberg A, Knight S. Sleep Disturbances in Pediatric Chronic Fatigue Syndrome: A Review of Current Research. *J Clin Sleep Med.* 2015;11(7):757-64.
43. Jason LA, Evans M, So S, Scott J, Brown A. Problems in defining post-exertional malaise. *J Prev Interv Community.* 2015;43(1):20-31.
44. McManimen SL, Jason LA. Post-Exertional Malaise in Patients with ME and CFS with Comorbid Fibromyalgia. *SRL Neurol Neurosurg.* 2017;3(1):22-7.
45. VanNess JM, Stevens SR, Bateman L, Stiles TL, Snell CR. Postexertional malaise in women with chronic fatigue syndrome. *J Womens Health (Larchmt).* 2010;19(2):239-44.
46. Twisk FN. Accurate diagnosis of myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome based upon objective test methods for characteristic symptoms. *World J Methodol.* 2015;5(2):68-87.
47. Hall DL, Lattie EG, Antoni MH, Fletcher MA, Czaja S, Perdomo D, et al. Stress management skills, cortisol awakening response, and post-exertional malaise in Chronic Fatigue Syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;49:26-31.
48. Brown AA, Jason LA. Validating a measure of myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome symptomatology. *Fatigue.* 2014;2(3):132-52.
49. McManimen SL, Jason LA. Differences in ME and CFS Symptomology in Patients with Normal and Abnormal Exercise Test Results. *Int J Neurol Neurother.* 2017;4(1).
50. Oosterwijk JV, Marusic U, De Wandele I, Paul L, Meeus M, Moorkens G, et al. The Role of Autonomic Function in Exercise-induced Endogenous Analgesia: A Case-control Study in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome and Healthy People. *Pain Physician.* 2017;20(3):E389-E99.

51. McManimen SL, Jason LA, Williams YJ. Variability in Symptoms Complicates Utility of Case Definitions. *Fatigue*. 2015;3(3):164-72.
52. Harris S, Gilbert M, Beasant L, Linney C, Broughton J, Crawley E. A qualitative investigation of eating difficulties in adolescents with chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Clin Child Psychol Psychiatry*. 2017;22(1):128-39.
53. Jason LA, Ropacki MT, Santoro NB, Richman JA, Heatherly W, Taylor R, et al. A Screening Instrument for Chronic Fatigue Syndrome. *Journal of Chronic Fatigue Syndrome*. 2011;3(1):39-59.
54. Murdock KW, Wang XS, Shi Q, Cleeland CS, Fagundes CP, Vernon SD. The utility of patient-reported outcome measures among patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Qual Life Res*. 2017;26(4):913-21.
55. Pendergrast T, Brown A, Sunnquist M, Jantke R, Newton JL, Strand EB, et al. Housebound versus nonhousebound patients with myalgic encephalomyelitis and chronic fatigue syndrome. *Chronic Illn*. 2016;12(4):292-307.
56. Baraniuk JN, Adewuyi O, Merck SJ, Ali M, Ravindran MK, Timbol CR, et al. A Chronic Fatigue Syndrome (CFS) severity score based on case designation criteria. *Am J Transl Res*. 2013;5(1):53-68.
57. Purcell A, Fleming J, Bennett S, Burmeister B, Haines T. Determining the minimal clinically important difference criteria for the Multidimensional Fatigue Inventory in a radiotherapy population. *Support Care Cancer*. 2010;18(3):307-15.
58. Collin SM, Nikolaus S, Heron J, Knoop H, White PD, Crawley E. Chronic fatigue syndrome (CFS) symptom-based phenotypes in two clinical cohorts of adult patients in the UK and The Netherlands. *J Psychosom Res*. 2016;81:14-23.
59. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G. Immunological aspects of chronic fatigue syndrome. *Autoimmun Rev*. 2009;8(4):287-91.
60. Natelson BH, Lange G. A status report on chronic fatigue syndrome. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 4:673-7.
61. Chia J, Chia A, Voeller M, Lee T, Chang R. Acute enterovirus infection followed by myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) and viral persistence. *J Clin Pathol*. 2010;63(2):165-8.
62. Lerner AM, Dworkin HJ, Sayyed T, Chang CH, Fitzgerald JT, Beqaj S, et al. Prevalence of abnormal cardiac wall motion in the cardiomyopathy associated with incomplete multiplication of Epstein-barr Virus and/or cytomegalovirus in patients with chronic fatigue syndrome. *In Vivo*. 2004;18(4):417-24.
63. Naess H, Sundal E, Myhr KM, Nyland HI. Postinfectious and chronic fatigue syndromes: clinical experience from a tertiary-referral centre in Norway. *In Vivo*. 2010;24(2):185-8.

64. Miller NA, Carmichael HA, Calder BD, Behan PO, Bell EJ, McCartney RA, et al. Antibody to Coxsackie B virus in diagnosing postviral fatigue syndrome. *BMJ*. 1991;302(6769):140-3.
65. Savoldo B, Huls MH, Liu Z, Okamura T, Volk HD, Reinke P, et al. Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection. *Blood*. 2002;100(12):4059-66.
66. Straus SE, Dale JK, Tobi M, Lawley T, Preble O, Blaese RM, et al. Acyclovir treatment of the chronic fatigue syndrome. Lack of efficacy in a placebo-controlled trial. *N Engl J Med*. 1988;319(26):1692-8.
67. Lerner AM, Beqaj SH, Deeter RG, Fitzgerald JT. Valacyclovir treatment in Epstein-Barr virus subset chronic fatigue syndrome: thirty-six months follow-up. *In Vivo*. 2007;21(5):707-13.
68. Bansal AS, Bradley AS, Bishop KN, Kiani-Alikhan S, Ford B. Chronic fatigue syndrome, the immune system and viral infection. *Brain Behav Immun*. 2012;26(1):24-31.
69. ter Wolbeek M, van Doornen LJ, Kavelaars A, van de Putte EM, Schedlowski M, Heijnen CJ. Longitudinal analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine production in severely fatigued adolescents. *Brain Behav Immun*. 2007;21(8):1063-74.
70. Roerink ME, Knoop H, Bredie SJ, Heijnen M, Joosten LA, Netea MG, et al. Cytokine inhibition in chronic fatigue syndrome patients: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2015;16:439.
71. Brenu EW, Huth TK, Hardcastle SL, Fuller K, Kaur M, Johnston S, et al. Role of adaptive and innate immune cells in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *Int Immunol*. 2014;26(4):233-42.
72. Nancy AL, Shoenfeld Y. Chronic fatigue syndrome with autoantibodies--the result of an augmented adjuvant effect of hepatitis-B vaccine and silicone implant. *Autoimmun Rev*. 2008;8(1):52-5.
73. Gerrity TR, Papanicolaou DA, Amsterdam JD, Bingham S, Grossman A, Hedrick T, et al. Immunologic aspects of chronic fatigue syndrome. Report on a Research Symposium convened by The CFIDS Association of America and co-sponsored by the US Centers for Disease Control and Prevention and the National Institutes of Health. *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(6):351-7.
74. Appel S, Chapman J, Shoenfeld Y. Infection and vaccination in chronic fatigue syndrome: myth or reality? *Autoimmunity*. 2007;40(1):48-53.
75. Walsh CM, Zainal NZ, Middleton SJ, Paykel ES. A family history study of chronic fatigue syndrome. *Psychiatr Genet*. 2001;11(3):123-8.
76. Corfield EC, Martin NG, Nyholt DR. Familiality and Heritability of Fatigue in an Australian Twin Sample. *Twin Res Hum Genet*. 2017;20(3):208-15.

77. Buchwald D, Herrell R, Ashton S, Belcourt M, Schmaling K, Sullivan P, et al. A twin study of chronic fatigue. *Psychosom Med*. 2001;63(6):936-43.
78. Roy-Byrne P, Afari N, Ashton S, Fischer M, Goldberg J, Buchwald D. Chronic fatigue and anxiety/depression: a twin study. *Br J Psychiatry*. 2002;180:29-34.
79. Rajeevan MS, Dimulescu I, Murray J, Falkenberg VR, Unger ER. Pathway-focused genetic evaluation of immune and inflammation related genes with chronic fatigue syndrome. *Hum Immunol*. 2015;76(8):553-60.
80. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol*. 2005;58(8):826-32.
81. Schlauch KA, Khaiboullina SF, De Meirleir KL, Rawat S, Petereit J, Rizvanov AA, et al. Genome-wide association analysis identifies genetic variations in subjects with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Transl Psychiatry*. 2016;6:e730.
82. Smith AK, Fang H, Whistler T, Unger ER, Rajeevan MS. Convergent genomic studies identify association of GRIK2 and NPAS2 with chronic fatigue syndrome. *Neuropsychobiology*. 2011;64(4):183-94.
83. Hartmann C, Corre-Menguy F, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Briere C. [MicroRNAs: a new class of gene expression regulators]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20(10):894-8.
84. Baulande S, Criqui A, Duthieuw M. [Circulating miRNAs as a new class of biomedical markers]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(3):289-96.
85. Brenu EW, Ashton KJ, van Driel M, Staines DR, Peterson D, Atkinson GM, et al. Cytotoxic lymphocyte microRNAs as prospective biomarkers for Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *J Affect Disord*. 2012;141(2-3):261-9.
86. Brenu EW, Ashton KJ, Batovska J, Staines DR, Marshall-Gradisnik SM. High-throughput sequencing of plasma microRNA in chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014;9(9):e102783.
87. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015;14:6.
88. Vermeulen HHM. Genetic epidemiology of homocysteine and related diseases. 2009:224 p.
89. Alberto JM, Hamelet J, Noll C, Blaise S, Bronowicki JP, Gueant JL, et al. Mice deficient in cystathionine beta synthase display altered homocysteine remethylation pathway. *Mol Genet Metab*. 2007;91(4):396-8.
90. Veeranki S, Tyagi SC. Defective homocysteine metabolism: potential implications for skeletal muscle malfunction. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):15074-91.

91. de Oliveira AC, D'Almeida V, Hipolide DC, Nobrega JN, Tufik S. Sleep deprivation reduces total plasma homocysteine levels in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2002;80(3):193-7.
92. Nichols TW, Jr., Gaiteri C. Morton's foot and pyridoxal 5'-phosphate deficiency: genetically linked traits. *Med Hypotheses*. 2014;83(6):644-8.
93. Sanchez C, Aranda P, Planells E, Galindo P, Perez de la Cruz A, Larrubia M, et al. Influence of low-protein dietetic foods consumption on quality of life and levels of B vitamins and homocysteine in patients with chronic renal failure. *Nutr Hosp*. 2010;25(2):238-44.
94. O'Leary F, Samman S. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*. 2010;2(3):299-316.
95. Patanwala I, King MJ, Barrett DA, Rose J, Jackson R, Hudson M, et al. Folic acid handling by the human gut: implications for food fortification and supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2014;100(2):593-9.
96. Baugh CM, Krumdieck CL, Baker HJ, Butterworth CE, Jr. Studies on the absorption and metabolism of folic acid. I. Folate absorption in the dog after exposure of isolated intestinal segments to synthetic pteroylpolyglutamates of various chain lengths. *J Clin Invest*. 1971;50(10):2009-21.
97. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond)*. 2017;14:78.
98. Pizzorno J. Homocysteine: Friend or Foe? *Integr Med (Encinitas)*. 2014;13(4):8-14.
99. Tanaka T, Scheet P, Giusti B, Bandinelli S, Piras MG, Usala G, et al. Genome-wide association study of vitamin B6, vitamin B12, folate, and homocysteine blood concentrations. *Am J Hum Genet*. 2009;84(4):477-82.
100. Ientile R, Curro M, Ferlazzo N, Condello S, Caccamo D, Pisani F. Homocysteine, vitamin determinants and neurological diseases. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010;2:359-72.
101. Gorjipour F, Asadi Y, N KO, Effatkhah M, Samadikuchaksaraei A. Serum level of homocysteine, folate and vitamin-B12 in epileptic patients under carbamazepine and sodium valproate treatment: a systematic review and meta-analysis. *Iran Red Crescent Med J*. 2013;15(3):249-53.
102. Arnadottir M, Hultberg B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation*. 1996;61(3):509-12.
103. Machado DJ, Paula FJ, Sabbaga E, Ianhez LE. Hyperhomocyst(e)inemia in chronic stable renal transplant patients. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2000;55(5):161-8.

104. Sipahioglu MH, Saglam E, Oymak O, Sav T, Tokgoz B, Karaca H, et al. Effect of cyclosporine A on total homocysteine level in a rabbit model. *Transplant Proc.* 2005;37(5):2371-4.
105. Mech AW, Farah A. Correlation of clinical response with homocysteine reduction during therapy with reduced B vitamins in patients with MDD who are positive for MTHFR C677T or A1298C polymorphism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Psychiatry.* 2016;77(5):668-71.
106. Duthie SJ, Whalley LJ, Collins AR, Leaper S, Berger K, Deary IJ. Homocysteine, B vitamin status, and cognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(5):908-13.
107. Keshteli AH, Baracos VE, Madsen KL. Hyperhomocysteinemia as a potential contributor of colorectal cancer development in inflammatory bowel diseases: a review. *World J Gastroenterol.* 2015;21(4):1081-90.
108. Shukla SK, Cook D, Meyer J, Vernon SD, Le T, Clevidence D, et al. Changes in Gut and Plasma Microbiome following Exercise Challenge in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). *PLoS One.* 2015;10(12):e0145453.
109. Regland B, Andersson M, Abrahamsson L, Bagby J, Dyrehag LE, Gottfries CG. Increased concentrations of homocysteine in the cerebrospinal fluid in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Scand J Rheumatol.* 1997;26(4):301-7.
110. Chen S, Guo X, Dong S, Li Z, Sun Y. Relationship between lifestyle factors and hyperhomocysteinemia in general Chinese population: a cross-sectional study. *Postgrad Med.* 2017;129(2):216-23.
111. Hozyasz KK, Mostowska A, Szaflarska-Poplawska A, Lianeri M, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of genes involved in homocysteine metabolism in celiac disease. *Mol Biol Rep.* 2012;39(3):3123-30.
112. da Costa KA, Kozyreva OG, Song J, Galanko JA, Fischer LM, Zeisel SH. Common genetic polymorphisms affect the human requirement for the nutrient choline. *FASEB J.* 2006;20(9):1336-44.
113. Liang S, Zhou Y, Wang H, Qian Y, Ma D, Tian W, et al. The effect of multiple single nucleotide polymorphisms in the folic acid pathway genes on homocysteine metabolism. *Biomed Res Int.* 2014;2014:560183.
114. Kalani A, Kamat PK, Tyagi SC, Tyagi N. Synergy of homocysteine, microRNA, and epigenetics: a novel therapeutic approach for stroke. *Mol Neurobiol.* 2013;48(1):157-68.

115. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001;107(10):1263-73.
116. Ventura P, Panini R, Pasini MC, Scarpetta G, Salvioli G. N -Acetyl-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing thiols urinary excretion. *Pharmacol Res.* 1999;40(4):345-50.
117. Ubbink JB, van der Merwe A, Delport R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R, et al. The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism. *J Clin Invest.* 1996;98(1):177-84.
118. Cullen CE, Carter GT, Weiss MD, Grant PA, Saperstein DS. Hypohomocysteinemia: a potentially treatable cause of peripheral neuropathology? *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2012;23(1):59-65, x.
119. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011;108(2):219-34.
120. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
121. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6.
122. Singh NK. microRNAs Databases: Developmental Methodologies, Structural and Functional Annotations. *Interdiscip Sci.* 2017;9(3):357-77.
123. Yang LH, Wang SL, Tang LL, Liu B, Ye WL, Wang LL, et al. Universal stem-loop primer method for screening and quantification of microRNA. *PLoS One.* 2014;9(12):e115293.
124. Tornero-Esteban P, Rodriguez-Rodriguez L, Abasolo L, Tome M, Lopez-Romero P, Herranz E, et al. Signature of microRNA expression during osteogenic differentiation of bone marrow MSCs reveals a putative role of miR-335-5p in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:182.
125. Park JH, Shin C. MicroRNA-directed cleavage of targets: mechanism and experimental approaches. *BMB Rep.* 2014;47(8):417-23.
126. Da Sacco L, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. *Int J Mol Sci.* 2012;14(1):480-95.
127. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Kawaguchi T, Hirajima S, et al. Circulating microRNA profiles in plasma: identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function. *Oncotarget.* 2016;7(33):53820-36.

128. Gurtner A, Falcone E, Garibaldi F, Piaggio G. Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35:45.
129. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D68-73.
130. Li J, Lei K, Wu Z, Li W, Liu G, Liu J, et al. Network-based identification of microRNAs as potential pharmacogenomic biomarkers for anticancer drugs. *Oncotarget.* 2016;7(29):45584-96.
131. Houseley J, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell.* 2009;136(4):763-76.
132. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007;129(6):1141-51.
133. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007;447(7146):823-8.
134. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13(1):17-24.
135. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-41.
136. Aoi W, Sakuma K. Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs? *Front Physiol.* 2014;5:39.
137. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223-33.
138. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):5003-8.
139. Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2013;113(6):676-89.
140. Golkar Z, Battaria R, Pace DG, Bagasra O. Inhibition of Ebola Virus by Anti-Ebola miRNAs in silico. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(6):626-34.
141. Lièvre A. Implication et perspectives d'application clinique des microARN en cancérologie : exemple du cancer colorectal. *Cancéro digest.* 2011(3).
142. Bret C SJ. Regulation of gene expression by miRNA
Implications in hematopoiesis and in hematological malignancies. *Correspondances en Onco-hématologie.* 2009;Vol IV - n° 1.

143. Luo M, Li R, Ren M, Chen N, Deng X, Tan X, et al. Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets. *Sci Rep*. 2016;6:36687.
144. Kusaoi M, Yamaji K, Ishibe Y, Murayama G, Nemoto T, Sekiya F, et al. Separation of Circulating MicroRNAs Using Apheresis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Ther Apher Dial*. 2016;20(4):348-53.
145. Polakovicova M, Musil P, Laczo E, Hamar D, Kyselovic J. Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *Int J Mol Sci*. 2016;17(10).
146. Masi LN, Serdan TD, Levada-Pires AC, Hatanaka E, Silveira LD, Cury-Boaventura MF, et al. Regulation of Gene Expression by Exercise-Related Micrnas. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(6):2381-97.
147. Iwahashi S, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, et al. Epithelial-mesenchymal transition-related genes are linked to aggressive local recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Cancer Lett*. 2016;375(1):47-50.
148. Cho HJ, Kim SS, Nam JS, Kim JK, Lee JH, Kim B, et al. Low levels of circulating microRNA-26a/29a as poor prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma who underwent curative treatment. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017;41(2):181-9.
149. Cui Y, Su Y, Li L, Zhao S, Nan J, Yue Y, et al. [Radiofrequency ablation can reverse the abnormal circulating microRNA expression changes in patients with atrial fibrillation]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2015;43(12):1051-6.
150. Wang Q, Liu N, Yang X, Tu L, Zhang X. Small RNA-mediated responses to low- and high-temperature stresses in cotton. *Sci Rep*. 2016;6:35558.
151. Wong JJ, Au AY, Gao D, Pinello N, Kwok CT, Thoeng A, et al. RBM3 regulates temperature sensitive miR-142-5p and miR-143 (thermomirs), which target immune genes and control fever. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(6):2888-97.
152. Dasdag S, Akdag MZ, Erdal ME, Erdal N, Ay OI, Ay ME, et al. Long term and excessive use of 900 MHz radiofrequency radiation alter microRNA expression in brain. *Int J Radiat Biol*. 2015;91(4):306-11.
153. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res*. 2006;66(22):10843-8.
154. Stone N, Pangilinan F, Molloy AM, Shane B, Scott JM, Ueland PM, et al. Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. *PLoS One*. 2011;6(7):e21851.
155. Li C, Ni J, Liu YX, Wang H, Liang ZQ, Wang X. Response of MiRNA-22-3p and MiRNA-149-5p to Folate Deficiency and the Differential Regulation of MTHFR Expression in Normal and Cancerous Human Hepatocytes. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168049.

156. Liu K, Xuekelati S, Zhang Y, Yin Y, Li Y, Chai R, et al. Expression levels of atherosclerosis-associated miR-143 and miR-145 in the plasma of patients with hyperhomocysteinaemia. *BMC Cardiovasc Disord.* 2017;17(1):163.
157. Zhao JY, Qiao B, Duan WY, Gong XH, Peng QQ, Jiang SS, et al. Genetic variants reducing MTR gene expression increase the risk of congenital heart disease in Han Chinese populations. *Eur Heart J.* 2014;35(11):733-42.
158. Kalani A, Kamat PK, Familtseva A, Chaturvedi P, Muradashvili N, Narayanan N, et al. Role of microRNA29b in blood-brain barrier dysfunction during hyperhomocysteinemia: an epigenetic mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34(7):1212-22.
159. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, et al. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One.* 2013;8(6):e64795.
160. Garcia-Segura L, Perez-Andrade M, Miranda-Rios J. The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2013;6(1):16-31.
161. Baraniuk JN, Shivapurkar N. Exercise - induced changes in cerebrospinal fluid miRNAs in Gulf War Illness, Chronic Fatigue Syndrome and sedentary control subjects. *Sci Rep.* 2017;7(1):15338.
162. Shang J, Liu H, Zhou Y. Roles of microRNAs in prenatal chondrogenesis, postnatal chondrogenesis and cartilage-related diseases. *J Cell Mol Med.* 2013;17(12):1515-24.
163. McAlinden A, Varghese N, Wirthlin L, Chang LW. Differentially expressed microRNAs in chondrocytes from distinct regions of developing human cartilage. *PLoS One.* 2013;8(9):e75012.
164. Ma X, Zhou J, Zhong Y, Jiang L, Mu P, Li Y, et al. Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis. *Int J Med Sci.* 2014;11(8):810-8.
165. Dua K, Hansbro NG, Foster PS, Hansbro PM. MicroRNAs as therapeutics for future drug delivery systems in treatment of lung diseases. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;7(1):168-78.
166. Wang Y, Lieberman R, Pan J, Zhang Q, Du M, Zhang P, et al. miR-375 induces docetaxel resistance in prostate cancer by targeting SEC23A and YAP1. *Mol Cancer.* 2016;15(1):70.
167. Zitman-Gal T, Green J, Pasmanik-Chor M, Golan E, Bernheim J, Benchetrit S. Vitamin D manipulates miR-181c, miR-20b and miR-15a in human umbilical vein endothelial cells exposed to a diabetic-like environment. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13:8.

168. Zhang Y, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Fournier M, Cuenod M, et al. Decreased Brain Levels of Vitamin B12 in Aging, Autism and Schizophrenia. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146797.
169. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017;57(5):142-9.
170. Sanchez-Moreno C, Jimenez-Escrig A, Martin A. Stroke: roles of B vitamins, homocysteine and antioxidants. *Nutr Res Rev*. 2009;22(1):49-67.
171. Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2006;30(2):108-14.
172. Choe H, Hwang JY, Yun JA, Kim JM, Song TJ, Chang N, et al. Intake of antioxidants and B vitamins is inversely associated with ischemic stroke and cerebral atherosclerosis. *Nutr Res Pract*. 2016;10(5):516-23.
173. Zinck JW, de Groh M, MacFarlane AJ. Genetic modifiers of folate, vitamin B-12, and homocysteine status in a cross-sectional study of the Canadian population. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(6):1295-304.
174. Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M, Coin L, et al. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat Genet*. 2009;41(6):666-76.
175. Fedorowski A, Franceschini N, Brody J, Liu C, Verwoert GC, Boerwinkle E, et al. Orthostatic hypotension and novel blood pressure-associated gene variants: Genetics of Postural Hemodynamics (GPH) Consortium. *Eur Heart J*. 2012;33(18):2331-41.
176. Thomsen LC, McCarthy NS, Melton PE, Cadby G, Austgulen R, Nygard OK, et al. The antihypertensive MTHFR gene polymorphism rs17367504-G is a possible novel protective locus for preeclampsia. *J Hypertens*. 2017;35(1):132-9.
177. Oussalah A, Levy J, Filhine-Tresarrieu P, Namour F, Gueant JL. Association of TCN2 rs1801198 c.776G>C polymorphism with markers of one-carbon metabolism and related diseases: a systematic review and meta-analysis of genetic association studies. *Am J Clin Nutr*. 2017;106(4):1142-56.
178. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood*. 2001;97(4):1092-8.
179. Machado FR, Ferreira AG, da Cunha AA, Tagliari B, Mussulini BH, Wofchuk S, et al. Homocysteine alters glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity and oxidative status in rats hippocampus: protection by vitamin C. *Metab Brain Dis*. 2011;26(1):61-7.

Annexe 1 : Questionnaire DSQ

No. ID _____

Date _____

«DePaul Symptom Questionnaire» (DSQ)

Traduit de la version originale en anglais de Jason LA et al.

Veuillez SVP répondre aux questions suivants (*la forme masculine a été utilisée pour alléger le texte*)

1. Quelle est votre taille ? _____

2. Quel est votre poids ? _____

3. Quelle est votre date de naissance ? _____

4. Quel est votre sexe ? _____

5. A quelle race ou races appartenez-vous ?

☐ Noir, Afro-américain

☐ Blanc, Caucasien

☐ Autochtones

☐ Asiatique, Océanien

☐ Autre race (*spécifiez svp*) _____

6. Êtes-vous d'origine latine ou hispanique ?

☐ Oui

☐ Non

7. Quel est votre état matrimonial actuel ?

☐ Marié ou en habitation avec votre partenaire

☐ Séparé

☐ Veuf

☐ Divorcé

☐ Jamais marié

8. Est-ce que vous avez des enfants ?

- ☐ Oui
☐ Non (*passer à la question 9*)

8a. Combien d'enfants avez-vous ? _____

8b. Combien de vos enfants ont moins de 18 ans ? _____

9. Combien de personne résident dans votre foyer ? _____

10. Quel est votre niveau de scolarité ou quel est votre dernier diplôme obtenu ?

- ☐ Aucune formation au niveau secondaire
☐ Quelque(s) années de complétées au niveau de l'école secondaire
☐ Diplôme d'étude secondaire ou équivalent
☐ Études collégiales ou CÉGEP
☐ Étude universitaire partielle (au moins un an) ou formation professionnelle
☐ Diplôme universitaire de premier cycle (baccalauréat)
☐ Étude graduée incluant maîtrise et doctorat

11. Quel est votre statut comme travailleur présentement ? (Cochez toutes les cases qui s'appliquent à vous)

- ☐ Invalidité
☐ Étudiant
☐ Ménager
☐ Retraité
☐ Sans emploi
☐ Travailleur à temps-partiel
☐ Travailleur à temps-plein

11a. Si vous êtes invalide, pour quelle condition recevez-vous une indemnité d'invalidité?

Spécifiez SVP _____

12. Quelle est votre profession actuelle?

Présentement _____

12a. Si vous ne travaillez pas actuellement, quelle était votre occupation la plus récente? La plus récente _____

Pour les questions suivantes (13-66), nous aimerions savoir **combien de fois vous avez eu chaque symptôme et combien chaque symptôme vous a dérangé au cours des 6 derniers mois**. Pour chaque symptôme, veuillez encrer un **chiffre pour la fréquence et un chiffre pour la sévérité**. Veuillez remplir le tableau de gauche à droite.

Symptômes	Fréquence :					Sévérité :				
	Au cours des 6 derniers mois , à quelle fréquence avez-vous eu ce symptôme ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Pas du tout 1 = Un peu du temps 2 = Environ la moitié du temps 3 = La plupart du temps 4 = Tout le temps					Au cours des 6 derniers mois , à quel point ce symptôme vous a-t-il dérangé ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Symptôme non-présent 1 = Légèrement 2 = Modérément 3 = Sévèrement 4 = Très sévèrement				
13) Fatigue	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
14) Sensation de lourdeur après le début de l'exercice	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
15) Douleur ou fatigue le lendemain des activités quotidiennes non-difficiles	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
16) Mentalement fatigué après le moindre effort	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
17) Un exercice minimum vous rend fatigué physiquement	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
18) Physiquement drainée ou malade après une activité légère	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
19) Vous vous sentez rafraîchi après votre réveil le matin	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
20) Besoin de prendre une sieste tous les jours	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
21) Problèmes de s'en dormir	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
22) Problèmes de rester éveillé	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
23) Se réveiller tôt le matin (e.g. 3h00)	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
24) Dormir toute la journée et rester éveillé la nuit	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
25) Douleur dans vos muscles	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
26) Douleur/raideur/sensibilité dans plus d'une articulation sans gonflement ou rougeur apparent	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
27) Douleur oculaire (yeux)	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4

Symptômes	Fréquence :					Sévérité :				
	Au cours des 6 derniers mois , à quelle fréquence avez-vous eu ce symptôme ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Pas du tout 1 = Un peu du temps 2 = Environ la moitié du temps 3 = La plupart du temps 4 = Tout le temps					Au cours des 6 derniers mois , à quel point ce symptôme vous a-t-il dérangé ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Symptôme non-présent 1 = Légèrement 2 = Modérément 3 = Sévèrement 4 = Très sévèrement				
28) Douleur au niveau de la poitrine	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
29) Ballonnement	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
30) Douleur à l'abdomen / estomac	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
31) Maux de tête	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
32) Spasmes musculaires	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
33) Faiblesse musculaire	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
34) Sensibilité aux bruits	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
35) Sensibilité aux lumières fortes	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
36) Problèmes de mémoire	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
37) Difficulté à se concentrer pendant une longue période de temps	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
38) Difficulté à trouver le bon mot pour dire ou exprimer des pensées	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
39) Difficulté à comprendre des choses	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
40) Seulement capable de se concentrer sur une chose à la fois	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
41) Incapable de focaliser votre vision ou votre attention	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
42) Perte de perception de la profondeur	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
43) Lenteur de la pensée	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
44) Distraction ou oubli	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
45) Problèmes de vessie	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
46) Problèmes d'intestin irritable	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4

Symptômes	Fréquence :					Sévérité :				
	Au cours des 6 derniers mois , à quelle fréquence avez-vous eu ce symptôme ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Pas du tout 1 = Un peu du temps 2 = Environ la moitié du temps 3 = La plupart du temps 4 = Tout le temps					Au cours des 6 derniers mois , à quel point ce symptôme vous a-t-il dérangé ? Pour chaque symptôme répertorié ci-dessous, encerclez un chiffre de: 0 = Symptôme non-présent 1 = Légèrement 2 = Modérément 3 = Sévèrement 4 = Très sévèrement				
47) La nausée	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
48) Sensation d'être instable sur vos pieds, comme si vous pourriez tomber	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
49) Essoufflement ou difficulté pour attraper votre souffle	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
50) Étourdissements ou évanouissements	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
51) Battements de cœur irréguliers	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
52) Perdre ou prendre du poids sans essayer	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
53) Pas d'appétit	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
54) Transpiration des mains	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
55) Sueurs nocturnes	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
56) Membres froids (e.g. bras, jambes, mains)	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
57) Sensation de frissons	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
58) Sensation de chaleur ou de froid sans raison	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
59) Sentiment que vous avez une température élevée	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
60) Sentiment que vous avez une température basse	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
61) Intolérance à l'alcool	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
62) Mal de gorge	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
63) Ganglions lymphatiques tendre	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
64) Fièvre	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
65) Symptômes ressemblant à la grippe	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
66) Certaines odeurs, aliments, médicaments ou produits chimiques vous font sentir malade	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4

67. Avez-vous **toujours** eu des problèmes persistants ou récurrents de fatigue / énergie, même remontant à vos premiers souvenirs d'enfance ? (Par persistants ou récurrents, on entend que les problèmes de fatigue / énergie sont habituellement en cours et constants, mais parfois il y a de bonnes périodes et de mauvaises périodes.)

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

68. Depuis que votre maladie liée à la fatigue / manque d'énergie a commencé, vos maux de tête se produisent-ils plus souvent, sont pires ou plus sévères, ou sont-ils dans un endroit différent sur la tête?

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

69. Depuis combien de temps éprouvé vous de la fatigue / manque d'énergie ?

- ☐ Moins de 6 mois
- ☐ 6 à 12 mois
- ☐ 1 à 2 ans
- ☐ Plus que 2 ans
- ☐ Problème de fatigue /manque d'énergie depuis l'enfance ou l'adolescence
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

70. Est-ce que vous avez reçu un diagnostic de syndrome de fatigue chronique ou d'encéphalomyélite myalgique ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

70a. Si oui, en quelle année avez-vous été diagnostiqué ? _____

70b. Avez-vous actuellement un diagnostic de syndrome de fatigue chronique ou d'encéphalomyélite myalgique ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

70c. Qui vous a diagnostiqué avec le syndrome de fatigue chronique ou d'encéphalomyélite myalgique ?

- ☐ Médecin
- ☐ Praticien alternatif (ex : ostéopathe, chiropraticien, physiothérapeute)
- ☐ Auto-diagnostiqué

70d. Est-ce que vous avez d'autres membres de votre famille qui ont été diagnostiqués avec le syndrome de fatigue chronique ou d'encéphalomyélite myalgique ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

Si oui, veuillez SVP indiquer leur lien de parenté avec vous et leur âge actuel

71. Avez-vous éprouvé l'un des symptômes suivants régulièrement et à plusieurs reprises dans les mois et les années avant que vos problèmes de fatigue / d'énergie ont commencé ?

- ☐ Gorge irritée
- ☐ Ganglions lymphatiques tendre / sensible
- ☐ Sommeil non réparateur
- ☐ Troubles de la mémoire et de la concentration
- ☐ Fatigue prolongée après un effort physique ou mental
- ☐ Douleur musculaire
- ☐ Maux de tête
- ☐ Douleur articulaire
- ☐ Pas de problème de fatigue / énergie

72. Si vous vous reposez, est-ce que votre problème de **fatigue** / **énergie** disparaît ? (**Cochez une seule réponse**).

- ☐ Entièrement
- ☐ Partiellement
- ☐ Mon problème de fatigue / d'énergie n'est pas amélioré par le repos (*sauter à la question 73*)
- ☐ Je n'ai pas de problème avec la fatigue / l'énergie (*sauter à la question 73*)

72a. Combien de temps avez-vous besoin de vous reposer pour que votre problème de **fatigue** / **d'énergie** disparait entièrement ou partiellement ?

- ☐ Moins que 30 minutes
- ☐ 30 à 59 minutes
- ☐ 1 à 2 heures
- ☐ Plus que 2 heures

73. Si vous étiez épuisé après avoir activement participé à des activités parascolaires, des sports ou des sorties avec des amis, étiez-vous capable de récupérer après une heure ou deux suite à cette activité ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

74. Réduisez-vous votre niveau d'activité pour éviter de rencontrer des problèmes de **fatigue** / **d'énergie**?

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

75. Rencontrez-vous une aggravation de votre **fatigue** / **manque d'énergie** liées à la maladie après vous avoir engagé dans un effort physique minimal?

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

75a. Rencontrez-vous une aggravation de votre **fatigue** / **manque d'énergie** liées à la maladie après vous avoir engagé dans un effort mental ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

75b. Si votre condition s'aggrave après une activité, combien de temps cet état dure?

- ☐ 1 heure ou moins
- ☐ 2 à 3 heures
- ☐ 4 à 10 heures
- ☐ 11 à 13 heures
- ☐ 14 à 23 heures
- ☐ Plus que 24 heures (spécifiez SVP _____)

76. Est-ce que vous vous engagez actuellement dans n'importe quelle forme d'exercice?

☐ Oui (*sautez à la question 77*)

☐ Non

76a. Si vous ne faites pas d'exercice, quelles sont les raisons pour lesquelles vous ne faites pas d'exercice? (**Cochez toutes les cases auxquelles vous êtes d'accord**)

☐ Pas intéressé

☐ Pas le temps

☐ Je voudrais mais je ne peux pas en raison de problèmes de fatigue / manque d'énergie

☐ Je ne peux pas parce que l'exercice aggrave mes symptômes

77. Pendant combien de temps avez-vous développé votre **maladie liée à la fatigue ou au manque d'énergie**? (**cochez une seule réponse**)

☐ Au cours de 24 heures

☐ Au cours d'une semaine

☐ Au cours d'un mois

☐ Au cours de 2 à 6 mois

☐ Au cours de 7 à 12 mois

☐ Au cours de 1 à 2 ans

☐ Au cours de 3 ans ou plus

☐ Je ne suis pas malade

78. Comment décririez-vous le parcours de votre **maladie liée à la fatigue / au manque d'énergie**? (**cochez une seule réponse**)

☐ S'aggrave constamment

☐ S'améliore constamment

☐ Persiste (aucun changement)

☐ Rechute (ayant de bonnes périodes sans symptômes et de mauvaises périodes)

☐ Fluctuant (les symptômes s'améliorent et s'aggravent périodiquement, mais ne disparaissent jamais complètement)

☐ Pas de symptômes / je ne suis pas malade

79. Quel énoncé décrit le mieux votre **maladie liée à la fatigue / au manque d'énergie** au cours des **6 derniers mois**? (Cochez une seule réponse)

- ☐ Je ne suis pas capable de travailler ou de faire quoi que ce soit, et je suis alité
- ☐ Je peux marcher autour de la maison, mais je ne peux pas faire les travaux ménagers légers
- ☐ Je peux faire des travaux ménagers légers, mais je ne peux pas travailler à temps partiel
- ☐ Je ne peux travailler qu'à temps partiel au travail ou assumer que certaines responsabilités familiales
- ☐ Je peux travailler à plein temps, mais je n'ai plus d'énergie pour rien d'autre
- ☐ Je peux travailler à plein temps et assumer quelques responsabilités familiales, mais je n'ai pas d'énergie pour rien d'autre
- ☐ Je peux faire tout le travail ou m'occuper de mes responsabilités familiales sans aucun problème avec mon énergie

80. Est-ce que **vosre maladie liée à la fatigue/manque d'énergie** a commencé après avoir ressenti quelque chose tel qu'indiqué dans la liste qui suit ? (Cochez une ou plusieurs cases et précisez)

- ☐ Une maladie infectieuse_____
- ☐ Un accident_____
- ☐ Un voyage or une vacance_____
- ☐ Une immunisation (vaccin)_____
- ☐ Chirurgie_____
- ☐ Stresse sévère (évènement mauvais ou malheureux)_____
- ☐ Autre_____
- ☐ Je ne suis pas malade_____

81. Avez-vous déjà consulté un médecin ou un professionnel de la santé au sujet de votre problème de **fatigue / manque d'énergie**?

- ☐ Oui
- ☐ Non (*sautez a la question 83*)

82. Avez-vous actuellement un médecin traitant pour votre problème de **fatigue / manque d'énergie**?

- ☐ Oui
- ☐ Non

83. Avez-vous une maladie médicale qui pourrait être la cause de vos symptômes?

- ☐ Oui
☐ Non (*sautez a la question 84*)

83a. Quelle maladie médicale avez-vous?

Le nom de la maladie et l'année où elle a commencé: _____

83b. Pour laquelle de ces conditions-vous recevez actuellement un traitement? _____

84. Prenez-vous actuellement des médicaments (en vente libre sans ordonnance ou sur ordonnance)?

- ☐ Oui
☐ Non (*sautez a la question 86*)

84a. Quels médicaments est-ce que vous prenez? _____

85. Pensez-vous que le(s) médicament(s) est (sont) la (les) cause de votre problème avec la **fatigue / le manque d'énergie?**

- ☐ Oui
☐ Non (*sautez a la question 86*)
☐ Je n'ai pas de problème de fatigue/ d'énergie (*sautez a la question 86*)

85a. Veuillez SVP indiquer quels médicaments : _____

86. Avez-vous déjà été diagnostiqué (e) et / ou traité (e) pour l'un des éléments suivants : **(cochez toutes les réponses qui s'appliquent et notez les années éprouvées, les années de traitement et les médicaments (le cas échéant))**

- ☐ Dépression majeur _____
- ☐ Dépression majeur avec caractéristiques mélancoliques ou psychotiques _____

- ☐ Trouble bipolaire (maniaco-dépression) _____
- ☐ Anxiété _____
- ☐ Schizophrénie _____
- ☐ Trouble d'alimentation _____
- ☐ Abus de substance _____
- ☐ Sensibilités chimiques multiples _____
- ☐ Fibromyalgie _____
- ☐ Allergies _____
- ☐ Autres (spécifiez SVP) _____
- ☐ Aucun diagnostique / traitement _____

87. Selon vous, quelle est la cause de votre problème de **fatigue / manque d'énergie** ?

- ☐ Définitivement physique
- ☐ Principalement physique
- ☐ Également physique et psychologique
- ☐ Principalement psychologique
- ☐ Définitivement psychologique
- ☐ Pas de problème de fatigue / d'énergie

88. Pensez-vous que quelque chose de spécifique dans votre vie personnelle ou votre environnement explique votre problème de **fatigue / manque d'énergie** ?

- ☐ Oui
- ☐ Non (*sauter à la question 89*)
- ☐ Je n'ai pas de problème de fatigue / d'énergie (*sauter à la question 89*)

88a. Spécifiez SVP : _____

89. Au cours des **4 dernières semaines**, environ combien d'heures par semaine avez-vous passé à faire :

- ☐ Activités liées au ménage ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités sociales / récréatives ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités liées à la famille ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités liées au travail ? _____ heures par semaine

90. Au cours des **4 dernières semaines**, avez-vous dû réduire le nombre d'heures préalablement passées (avant votre maladie) à faire des activités professionnelles, sociales ou familiales en raison de votre santé ou de vos problèmes de **fatigue/ d'énergie** ?

- ☐ Oui
- ☐ Non (*sauter à la question 91*)
- ☐ Pas de problème de fatigue/ d'énergie

90a. Avant votre maladie liée à la fatigue/ l'énergie, environ combien d'heures avez-vous passé à faire :

- ☐ Activités liées au ménage ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités sociales / récréatives ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités liées à la famille ? _____ heures par semaine
- ☐ Activités liées au travail ? _____ heures par semaine

91. Veuillez évaluer la quantité **d'énergie** que vous aviez disponible **hier**, en utilisant une échelle de 1 à 100 où 1 = pas d'énergie et 100 = votre niveau d'énergie avant la maladie. (**Si vous n'avez pas une maladie liée à la fatigue/ l'énergie, un score de 100 = ayant une énergie abondante telle que vous pourriez travailler à plein temps et accomplir vos responsabilités familiales**)

92. Veuillez évaluer la quantité **d'énergie** que vous avez dépensé (utilisé) **hier**, en utilisant une échelle de 1 à 100 où 1 = pas d'énergie et 100 = votre énergie avant la maladie dépensée

93. SVP, notez la quantité de fatigue que vous aviez **hier**, en utilisant une échelle de 1 à 100 où 1 = aucune fatigue et 100 = fatigue sévère _____

94. Au cours de **la dernière semaine**, veuillez SVP évaluer la quantité **d'énergie** que vous aviez de disponible en utilisant l'échelle de 1 à 100 où 1 = pas d'énergie et 100 = votre niveau d'énergie avant la maladie _____

95. Au cours de **la dernière semaine**, veuillez SVP évaluer la quantité **d'énergie** que vous avez dépensée (utilisée) en utilisant une échelle de 1 à 100 où 1 = pas d'énergie et 100 = votre énergie avant la maladie dépensée _____

96. Au cours de **la dernière semaine**, veuillez SVP évaluer la quantité de **fatigue** que vous avez eu en utilisant une échelle de 1 à 100 où 1 = pas de fatigue et 100 = fatigue sévère

97. Depuis le début de vos problèmes de fatigue / d'énergie, vos symptômes ont-ils causé une réduction de 50% ou plus de votre niveau d'activité ?

- ☐ Oui
- ☐ Non
- ☐ Pas de problèmes de fatigue / d'énergie

98. Avez-vous des infections virales fréquentes avec des périodes de récupération prolongée ?

- ☐ Oui
- ☐ Non

99. Êtes-vous intolérant aux températures extrêmes (quand il fait extrêmement chaud ou froid)?

- ☐ Oui
- ☐ Non

Annexe 2 : Questionnaire MFI-20

QUESTIONNAIRE MULTIDIMENSIONNEL SUR LA FATIGUE

(French version of the MFI®)

® E. Smets, B. Garssen, B. Bonke.

Directives:

Au moyen des affirmations suivantes, nous souhaiterions savoir comment vous vous êtes senti(e) **récemment**. S'agissant, par exemple, de l'affirmation:

‘JE ME SENS DETENDU(E)’

Si vous pensez que c'est **tout à fait vrai**, que vous êtes réellement senti(e) détendu(e) récemment, veuillez cocher d'un X la case située à l'extrême gauche; comme ceci:

oui, c'est vrai ☒1 ☐2 ☐3 ☐4 ☐5 **non, ce n'est pas vrai**

Plus vous vous trouverez **en désaccord** avec une affirmation, plus vous déplacerez votre X en direction du ‘non ce n'est pas vrai’. Veuillez vous assurer qu'aucune affirmation n'est omise et cocher d'un X chacune d'elles.

1	Je me sens en forme.	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
2	Physiquement je n'ai pas la force de faire grand chose.	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
3	Je me sens très actif(ve)	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
4	J'ai envie de faire plein de choses agréables	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
5	Je me sens fatigué-e	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
6	Je crois que j'en fais beaucoup dans la journée	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
7	Je suis capable de me concentrer sur ce que j'entreprends	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
8	J'ai une bonne résistance physique	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
9	Je suis stressé-e à l'idée d'avoir quelque chose à faire	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
10	Je crois que je fais très peu dans une journée	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
11	J'arrive facilement à me concentrer	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
12	Je me sens reposé(e)	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
13	Il me faut beaucoup d'efforts pour me concentrer	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
14	Physiquement je me sens en mauvaise condition	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
15	J'ai beaucoup de projets	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
16	Je me fatigue facilement	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
17	Je n'achève que très peu de choses	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai

18	J'ai envie de ne rien faire	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
19	Je me laisse facilement distraire	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai
20	Physiquement je me sens en excellente forme	oui, c'est vrai	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5	non, ce n'est pas vrai

Merci pour votre participation.

Annexe 3 : Questionnaire SF-36

QUESTIONNAIRE GENERALISTE SF36 (QUALITE DE VIE)

Présentation :

Ce bilan de santé généraliste peut être utilisé en complément de bilans plus spécifiques.

Critères d'inclusion (les catégories majeures cliniques) :

Toutes catégories de personnes ayant des difficultés de santé.

Critères d'exclusion (ne pas utiliser pour) :

Aucun.

Critères de péjoration (diagnostic associé) :

Dépression, difficultés relationnelles.

Evolution du score :

Varie selon les items, afin de tester la vigilance du patient. La lecture des résultats fournit une appréciation sémantique.

Le questionnaire généraliste SF-36

QUESTIONNAIRE GENERALISTE SF36 (QUALITE DE VIE)

1.- En général, diriez-vous que votre santé est : (cocher ce que vous ressentez)

Excellente ___ Très bonne ___ Bonne ___ Satisfaisante ___ Mauvaise ___

2.- Par comparaison avec il y a un an, que diriez-vous sur votre santé aujourd'hui ?

Bien meilleure qu'il y a un an ___ Un peu meilleure qu'il y a un an ___

A peu près comme il y a un an ___ Un peu moins bonne qu'il y a un an ___

Pire qu'il y a un an ___

3.- vous pourriez vous livrer aux activités suivantes le même jour. Est-ce que

votre état de santé vous impose des limites dans ces activités ? Si oui, dans

quelle mesure ? (entourez la flèche).

a. Activités intenses : courir, soulever des objets lourds, faire du sport.

↓ ↓ ↓

Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

b. Activités modérées : déplacer une table, passer l'aspirateur.

↓ ↓ ↓

Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

c. Soulever et transporter les achats d'alimentation.

↓ ↓ ↓

Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

d. Monter plusieurs étages à la suite.

↓ ↓ ↓

Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

e. Monter un seul étage.

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

f. Vous agenouiller, vous accroupir ou vous pencher très bas.

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

g. Marcher plus d'un kilomètre et demi.

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

h. Marcher plus de 500 mètres

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

i. Marcher seulement 100 mètres.

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

QUESTIONNAIRE GENERALISTE SF36 (QUALITE DE VIE)

j. Prendre un bain, une douche ou vous habiller.

↓ ↓ ↓
Oui, très limité oui, plutôt limité pas limité du tout

4.- Au cours des 4 dernières semaines, avez-vous eu l'une des difficultés suivantes au travail ou lors des activités courantes, du fait de votre santé ? (réponse : oui ou non à chaque ligne)

oui non

Limiter le temps passé au travail, ou à d'autres activités ?

Faire moins de choses que vous ne l'espériez ?

Trouver des limites au type de travail ou d'activités possibles ?

Arriver à tout faire, mais au prix d'un effort

5.- Au cours des 4 dernières semaines, avez-vous eu des difficultés suivantes

au travail ou lors des activités courantes parce que vous étiez déprimé ou anxieux ? (réponse : oui ou non à chaque ligne).

oui non

Limiter le temps passé au travail, ou à d'autres activités ?

Faire moins de choses que vous n'espériez ?

Ces activités n'ont pas été accomplies aussi soigneusement que d'habitude ?

6.- Au cours des 4 dernières semaines, dans quelle mesure est-ce que votre

état physique ou mental ont perturbé vos relations avec la famille, les amis, les

voisins ou d'autres groupes ?

↓ ↓ ↓ ↓
Pas du tout très peu assez fortement énormément

7.- Avez-vous enduré des souffrances physiques au cours des 4 dernières semaines ?

↓ ↓ ↓ ↓
Pas du tout très peu assez fortement énormément

8.- Au cours des 4 dernières semaines la douleur a-t-elle gêné votre travail ou vos activités usuelles ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Pas du tout un peu modérément assez fortement énormément

9.- Ces 9 questions concernent ce qui s'est passé au cours de ces dernières 4

semaines. Pour chaque question, donnez la réponse qui se rapproche le plus

de ce que vous avez ressenti. Comment vous sentiez-vous au cours de ces 4

semaines :

a. vous sentiez-vous très enthousiaste ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

b. étiez-vous très nerveux ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

QUESTIONNAIRE GENERALISTE SF36 (QUALITE DE VIE)

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

c. étiez-vous si triste que rien ne pouvait vous égayer ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

d. vous sentiez-vous au calme, en paix ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

e. aviez-vous beaucoup d'énergie ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

f. étiez-vous triste et maussade ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

g. aviez-vous l'impression d'être épuisé(e) ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

h. étiez-vous quelqu'un d'heureux ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

i. vous êtes-vous senti fatigué(e) ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

10.- Au cours des 4 dernières semaines, votre état physique ou mental a-t-il gêné vos activités sociales comme des visites aux amis, à la famille, etc ?

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout le temps très souvent parfois peu souvent jamais

11.- Ces affirmations sont-elles vraies ou fausses dans votre cas ?

a. il me semble que je tombe malade plus facilement que d'autres.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout à fait vrai assez vrai ne sais pas plutôt faux faux

b. ma santé est aussi bonne que celle des gens que je connais.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout à fait vrai assez vrai ne sais pas plutôt faux faux

c. je m'attends à ce que mon état de santé s'aggrave.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout à fait vrai assez vrai ne sais pas plutôt faux faux

QUESTIONNAIRE GENERALISTE SF36 (QUALITE DE VIE)

d. mon état de santé est excellent.

↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Tout à fait vrai assez vrai ne sais pas plutôt faux faux

Wade JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). Medical Care 1992;30:473–483.